



HAL
open science

Étude biochimique d'extraits musculaires de sujets sensibles à l'hyperthermie maligne anesthésique

Nathalie Fouilhé

► **To cite this version:**

Nathalie Fouilhé. Étude biochimique d'extraits musculaires de sujets sensibles à l'hyperthermie maligne anesthésique. Sciences pharmaceutiques. 1995. dumas-01824328

HAL Id: dumas-01824328

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01824328>

Submitted on 27 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

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

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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

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

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

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

2^e exemplaire



D 115 017101 4

UNIVERSITE Joseph FOURIER - GRENOBLE 1 Sciences, Technologie, Médecine

U.F.R DE PHARMACIE

Domaine de la Merci - La Tronche

ANNÉE 1995

Numéro d'Ordre

7053

**MÉMOIRE
DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
PHARMACIE SPÉCIALISÉE**

Soutenu
le : 11 Décembre 1995
Par : Nathalie FOUILHÉ
[Données à caractère personnel]

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 04 Octobre 1988 tient lieu de :

**THÈSE
POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Étude biochimique d'extraits musculaires de sujets
sensibles à l'hyperthermie maligne anesthésique**

JURY

PRÉSIDENT : Monsieur le Professeur A. FAVIER
MEMBRES : Madame I. MEYLAN
Monsieur le Professeur H. PINATEL
Monsieur le Docteur J.F. PAYEN



UNIVERSITÉ Joseph FOURIER - GRENOBLE 1 Sciences, Technologie, Médecine

U.F.R DE PHARMACIE

Domaine de la Merci - La Tronche

ANNÉE 1995

Numéro d'Ordre 7053

**MÉMOIRE
DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
PHARMACIE SPÉCIALISÉE**

Soutenu
le : 11 Décembre 1995
Par : Nathalie FOUILHÉ

[Données à caractère personnel]

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 04 Octobre 1988 tient lieu de :

**THÈSE
POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Étude biochimique d'extraits musculaires de sujets
sensibles à l'hyperthermie maligne anesthésique**

JURY

PRÉSIDENT : Monsieur le Professeur A. FAVIER

MEMBRES : Madame I. MEYLAN
Monsieur le Professeur H. PINATEL
Monsieur le Docteur J.F. PAYEN



Je tiens à remercier :

Monsieur le Professeur A. FAVIER d'avoir bien voulu être mon tuteur au cours de ces quatre années d'internat et d'avoir accepté de présider ce jury,

Madame I. MEYLAN de m'avoir accueilli pendant deux semestres au sein de son service et d'avoir bien voulu juger ce travail,

Monsieur le Professeur H. PINATEL d'avoir accepté d'évaluer ce travail,

Monsieur le Docteur J.F. PAYEN pour ses compétences, son optimisme, sa disponibilité, et ses qualités humaines qui ont permis de mener à bien ce long travail.

Je remercie également :

L'équipe de Biophysique du CRSSA pour son hospitalité et l'aide matérielle qu'elle m'a apportée,

Christiane METRA, Claudine BESSON et Mme PAYEN pour leur disponibilité, leur aide efficace et précieuse en Biochimie,

Toute l'équipe de l'unité INSERM 438 qui me supporte depuis 3 ans (et ce n'est pas fini) et qui a facilité ma tâche.

J'ai une pensée particulière pour tous mes amis de promo avec lesquels j'ai partagé entre autres cinq longues années d'études sur les bancs de la faculté de pharmacie de Montpellier et qui ne peuvent être à mes côtés aujourd'hui à cause des distances.

Enfin, l'Hyperthermie Maligne n'est pas la Myasthénie mais ce sont toutes deux des maladies musculaires. Ce travail est bien peu de choses par rapport à tout ce qu'il reste à faire dans le domaine de ces maladies, mais j'espère que la flamme qui habite tous ceux qui cherchent avec ferveur ne s'éteindra pas...

Sommaire

I. Première partie : hyperthermie maligne anesthésique	9
I.1. Présentation de l'hyperthermie	10
I.1.1. Sémiologie	10
I.1.1.1. Épidémiologie	10
I.1.1.2. Signes cliniques et biologiques.....	10
I.1.1.3. Traitement.....	11
I.1.1.4. Génétique.....	11
I.1.2. Rappels physiologiques	13
I.1.2.1. Organisation de la cellule squelettique.....	13
I.1.2.2. Le couplage excitation-contraction.....	14
I.2. Etiopathogénie	15
I.2.1. HM et $[Ca^{2+}]$	15
I.2.2. Origines.....	16
I.2.3. Autres hypothèses.....	17
I.3. Tests de dépistage	20
I.3.1. Test de contracture <i>in vitro</i>	22
I.3.2. Test génétique.....	24
I.3.3. SRM ^{31}P <i>in vivo</i>	24
I.3.4. Analyse histologique.....	27
I.3.5. Test à la ryanodine	27
II. Deuxième partie : Halothane	28
II.1. Introduction	29
II.1.1. Structure chimique de l'halothane	30
II.1.2. Propriétés physicochimiques.....	30
II.2. Pharmacocinétique de l'halothane	31
II.2.1. Absorption	31
II.2.2. Distribution.....	31
II.2.3. Métabolisme.....	32
II.2.4. Élimination	32
II.3. Pharmacodynamie de l'halothane	33
II.3.1. Effets sur le système nerveux central	33
II.3.2. Effets sur le système cardiovasculaire	33
II.3.3. Effets sur le système respiratoire	34

II.3.4. Autres effets.....	34
II.4. Effets indésirables.....	35
II.4.1. Hépatiques.....	35
II.4.2. Autres effets indésirables.....	36
II.5. Précautions d'emploi.....	37
II.5.1. Contre-indications.....	37
II.5.2. Précautions d'emploi.....	37
II.5.3. Interactions médicamenteuses.....	38
II.6. Usage thérapeutique.....	39
II.6.1. Mode d'administration.....	39
II.6.2. Posologie.....	40
II.7. Halothane et HM.....	41
II.8. Autres agents déclenchants.....	44
II.8.1. Isoflurane, Enflurane, Desflurane, Sévoflurane.....	44
II.8.2. Suxaméthonium.....	46
III. Troisième partie : Dantrolène (Dantrium®).....	47
III.1. Introduction.....	48
III.1.1. Structure chimique du dantrolène.....	48
III.1.2. Propriétés physicochimiques.....	48
III.2. Pharmacocinétique du dantrolène.....	49
III.2.1. Absorption.....	49
III.2.2. Distribution.....	49
III.2.3. Métabolisme.....	49
III.2.4. Élimination.....	49
III.3. Pharmacologie du dantrolène.....	50
III.4. Effets indésirables.....	51
III.4.1. Effets musculaires.....	51
III.4.2. Effets hépatiques.....	51
III.4.3. Effets cutanés.....	51
III.4.4. Effets neurologiques.....	51
III.4.5. Effets gastro-intestinaux.....	52
III.4.6. Autres effets.....	52
III.5. Précautions d'emploi.....	52
III.5.1. Contre-indications.....	52
III.5.2. Précautions d'emploi.....	52
III.5.3. Interactions médicamenteuses.....	53
III.6. Usage thérapeutique.....	53
III.6.1. Indications thérapeutiques.....	53

III.6.1.1. Spasticité.....	53
III.6.1.2. Hyperthermie maligne.....	53
III.6.1.3. Syndrome malin des neuroleptiques.....	54
III.6.2. Mode d'administration et posologie.....	54
III.6.2.1. Spasticité.....	54
III.6.2.2. Hyperthermie maligne.....	54
III.6.2.3. Syndrome malin des neuroleptiques.....	55
III.6.3. Présentations et dosages.....	55

IV. Quatrième partie : Expérimentation..... 56

IV.1. Introduction..... 57

IV.2. Matériel et méthodes..... 58

IV.2.1. Matériel..... 58

IV.2.2. Méthodes..... 58

IV.2.2.1. Analyse par SRM des extraits perchloriques..... 58

IV.2.2.1.1. Extraits perchloriques..... 58

IV.2.2.1.1.1. Étape 1 : première lyophilisation..... 60

IV.2.2.1.1.2. Étape 2 : deuxième lyophilisation..... 62

IV.2.2.1.1.3. Étape 3 : suspension dans l'eau lourde. 62

IV.2.2.1.2. SRM du Phosphore 31..... 64

IV.2.2.1.2.1. Préparation de l'échantillon..... 64

IV.2.2.1.2.2. Acquisition SRM..... 64

IV.2.2.1.2.3. Traitement du signal..... 64

IV.2.2.2. Identification biochimique..... 65

IV.2.2.2.1. Étape de titration..... 65

IV.2.2.2.2. Étape de corésonance..... 65

IV.2.2.3. Analyse lipidique par chromatographie..... 66

IV.2.2.3.1. Extraction des lipides totaux..... 66

IV.2.2.3.2. Identification des lipides..... 67

IV.2.2.3.3. Quantification des lipides..... 67

IV.2.2.3.3.1. Préparation de l'appareil..... 67

IV.2.2.3.3.2. Préparation des cuves..... 67

IV.2.2.3.3.3. Brûlage des rods..... 68

IV.2.2.3.3.4. Dépôt des échantillons..... 68

IV.2.2.3.3.5. Première migration..... 68

IV.2.2.3.3.6. Lecture des rods au Iatroscan..... 68

IV.2.2.3.3.7. Deuxième migration..... 68

IV.2.2.3.3.8. Analyse des spectres..... 68

IV.2.2.4. Analyse histologique..... 69

IV.2.2.5. Analyse SRM <i>in vivo</i>	69
IV.2.2.6. Analyse statistique	69
IV.3. Résultats	70
IV.3.1. Identification de la résonance des PDE	70
IV.3.1.1. Étape de titration	70
IV.3.1.2. Étape de corésonance.....	71
IV.3.2. Analyse par SRM des extraits perchloriques.....	73
IV.3.2.1. Spectres RMN.....	73
IV.3.2.2. Comparaison HMS - HMN.....	74
IV.3.2.3. Comparaison <i>in vitro</i> - <i>in vivo</i>	75
IV.3.2.4. Corrélation GPC/histologie.....	77
IV.3.3. Analyse lipidique par chromatographie	78
IV.3.3.1. Identification des lipides musculaires.....	78
IV.3.3.2. Quantification des lipides musculaires.....	79
IV.4. Discussion	81
IV.5. Synthèse	87
V. Conclusions	88
VI. Références bibliographiques	91

Abréviations

5-HT : sérotonine
ADN : acide désoxyribonucléique
AG : acide gras
ATP : adénosine triphosphate
C/M : chloroforme/méthanol
CA : acétate de cholestérol
Ca²⁺ : ion calcium
[Ca²⁺]_i : concentration de calcium intracellulaire
Cdlp : cardiolipide
CDTA : acide trans -1,2 diamino cyclohexane -N,N,N',N' tétra acétique monohydrate
CE : cholestérol estérifié
CL : cholestérol libre
D⁺ : ion deutérium
D₂O : eau lourde
DSC : débit sanguin cérébral
EMHG : european malignant hyperthermia group
GP : glycérophosphate
GPC : glycérophosphorylcholine
GPE : glycérophosphoryléthanolamine
GPI : glycérophosphorylinositol
GPS : glycérophosphorylsérine
H⁺ : ion proton
HClO₄ : acide perchlorique
HFIP : hexafluoroisopropanol
HIP : hexane/isopropanol
HM : hyperthermie maligne
HME : hyperthermique malin équivoque
HMN : hyperthermique malin négatif
HMS : hyperthermique malin sensible
HPTLC : high performance thin layer chromatography
Hz : Hertz
InsP₃ : inositol 1,4,5-triphosphate
InsP₃5-ase : inositol 1,4,5-triphosphate phosphatase
KCl : chlorure de potassium
KOH : hydroxyde de potassium
L : lécithine ou phosphatidylcholine
LL : lysolécithine
MAC : concentration alvéolaire minimale
Mg²⁺ : ion magnésium
Mhz : megaHertz
NaCl : chlorure de sodium
PCA : acide perchlorique
PCr : phosphocréatine
pD : -log [D⁺]
PME : phosphomonoester
PDE : phosphodiester
PdylE : phosphatidyléthanolamine
PdylG : phosphatidylglycérol
PdylI : phosphatidylinositol
PdylS : phosphatidylsérine
Pi : phosphate inorganique
ppm : partie par million
RMN : résonance magnétique nucléaire

rpm : rotation par minute
RS : réticulum sarcoplasmique
RYR : récepteur à la ryanodine
S : sphingomyéline
SD : déviation standard
SI : standard interne
SQ : squalène
SRM^{31P} : spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du phosphore 31
TG : triglycéride
Tln : surface totale des pics du spectre des lipides neutres obtenu par ionisation de flamme
TP : surface totale des pics du spectre obtenu par SRM ^{31P}
Tpl : surface totale des pics du spectre des phospholipides obtenu par ionisation de flamme
UV : ultraviolet

Première partie :

**hyperthermie maligne
anesthésique**

I.1. Présentation de l'hyperthermie

I.1.1. Sémiologie

I.1.1.1. Épidémiologie

L'hyperthermie maligne anesthésique (HM) se présente comme une myopathie infra-clinique rare (incidence proche de 1/20000 anesthésies et le nombre de nouveaux cas est de 20 à 50 par an), génétiquement transmissible sur un mode autosomique dominant, déclenchée au cours d'une anesthésie générale par des agents pharmacologiques : gaz halogénés (halothane, enflurane, isoflurane...) ou curare dépolarisant (suxaméthonium) dans 91 à 97% des cas. La crise se produit chez des sujets ayant une histoire familiale liée à l'HM dans 24 à 30% des cas ou ayant une myopathie associée (6.4 à 7.8%). L'âge moyen de survenue d'une crise est 17 à 18 ans et 63 à 66% des crises se produisent chez l'homme [Jacquot 1988, Prather Strazis 1993].

I.1.1.2. Signes cliniques et biologiques

La forme typique de la crise d'HM se révèle par une brutale montée de température (de 1 à 6 °C par heure), classiquement sans sueur, une rigidité musculaire généralisée, et des signes circulatoires et respiratoires inhabituels lors d'une anesthésie générale : tachycardie, troubles du rythme cardiaque, instabilité tensionnelle, hyperventilation. La concentration expirée du CO₂ augmente, et des désordres biochimiques apparaissent : rhabdomyolyse (concentration sanguine de la créatine phosphokinase augmentée dans plus de 70% des cas), acidose respiratoire et métabolique, hyperkaliémie, troubles de l'hémostase, insuffisance rénale aiguë, mettant directement en jeu le pronostic vital du sujet. A côté de cette forme typique, fulminante, de nombreuses formes cliniques, souvent trompeuses, peuvent se rencontrer : fièvre post-opératoire inexplicquée, rhabdomyolyse isolée... L'ordre d'apparition des symptômes n'est pas clairement défini mais il semblerait que l'augmentation de la PetCO₂ soit le premier signe clinique détectable [Chambers 1994] comme cela a été confirmé par une étude chez le porc [Ryan 1994]. Enfin, la crise d'HM ne se révèle pas forcément lors de la première anesthésie sans que l'on sache réellement l'expliquer.

I.1.1.3. Traitement

Outre les mesures habituelles de réanimation (oxygénation, refroidissement, correction des troubles hydro-électrolytiques, expansion volémique), l'arrêt de l'anesthésie et de l'intervention chirurgicale dès que possible, le traitement spécifique repose sur l'administration en IV de dantrolène de sodium (Dantrium®) à la dose de 2.5 mg/kg, connu pour ses propriétés myorelaxantes. Des moyens de surveillance appropriés, la rapidité de la mise en œuvre du traitement et une prévention efficace sont les principaux critères requis pour réduire la mortalité de l'HM estimée actuellement entre 10 et 50% des cas.

I.1.1.4. Génétique

Des travaux de génétique moléculaire ont permis de localiser un des gènes candidats à la prédisposition pour l'HM sur le chromosome 19 humain dans la région q13.1 [MacCarthy 1990, MacLennan 1990]. L'implication du récepteur à la ryanodine (RYR) a été confirmée par des études de liaison entre phénotype HM sensible (HMS) et gène RYR1 [MacLennan 1990] et par la présence d'une mutation transformant une Arginine⁶¹⁵ en Cystéine dans le RYR chez le porc HMS [MacLennan 1992].

Une étude sur cellules myoblastiques transfectées avec le gène du RYR sauvage ou muté a montré que les cellules exprimant le récepteur muté avaient une sensibilité plus grande à la caféine induisant une libération de calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) à travers le récepteur. De plus, l'exposition à des doses cliniques d'halothane entraînait une rapide augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ($[Ca^{2+}]_i$) dans ces mêmes cellules alors que cette concentration n'était pas modifiée dans les cellules exprimant le gène sauvage [Otsu 1994]. D'autres mutations sur ce récepteur ont été mises en évidence et sont retrouvées dans 3 à 10% des cas.

Mais l'identification du ou des gènes responsables n'est pas encore faite pour tous les sujets atteints puisque une absence de liaison entre gène RYR1 et phénotype HMS a été observée [Levitt 1991]. En revanche une liaison sur le chromosome 17q11.2-q24 avec une sous-unité du récepteur aux dihydropyridines a été mise en évidence chez cinq familles HMS [Levitt 1991]. D'autres loci sur les chromosomes 7 [Iles 1994] et 3 [Sudbrak 1995] ont aussi été suggérés pour avoir un lien avec la susceptibilité HM.

Ces travaux montrent que l'HM n'est certainement pas liée à une seule anomalie génétique et que la forme clinique de la crise résulte d'un ensemble de phénomènes provenant de ces différentes anomalies.

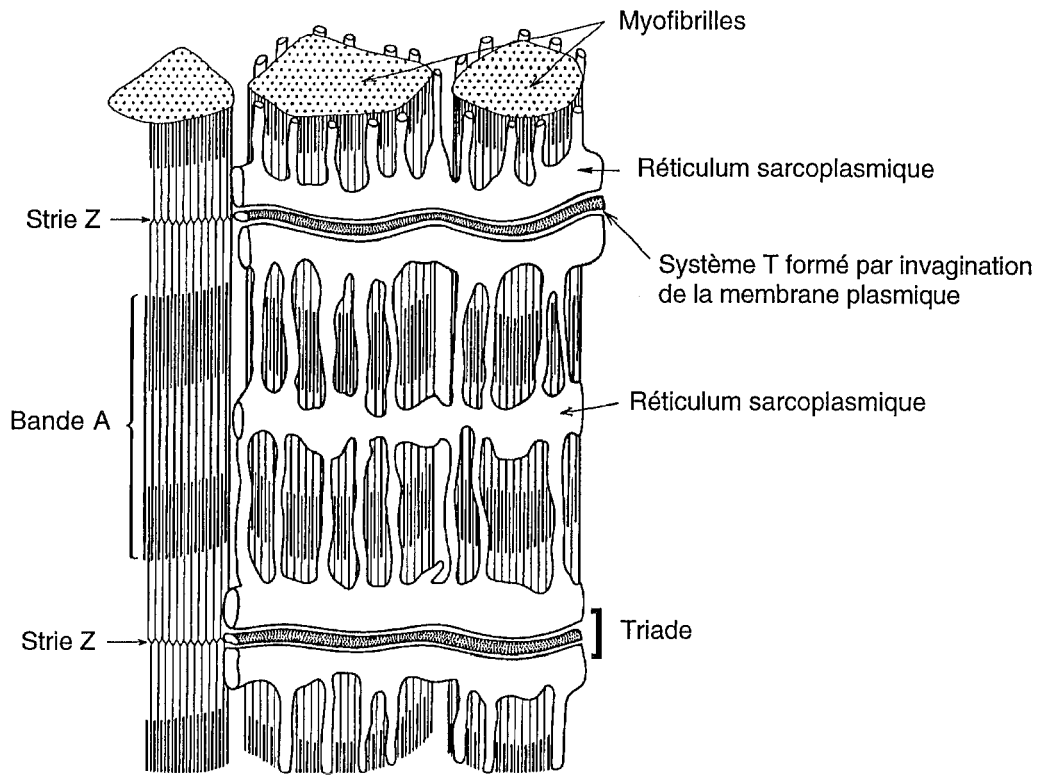


Figure I.1. Structure d'un myocyte d'après Favard 1987.

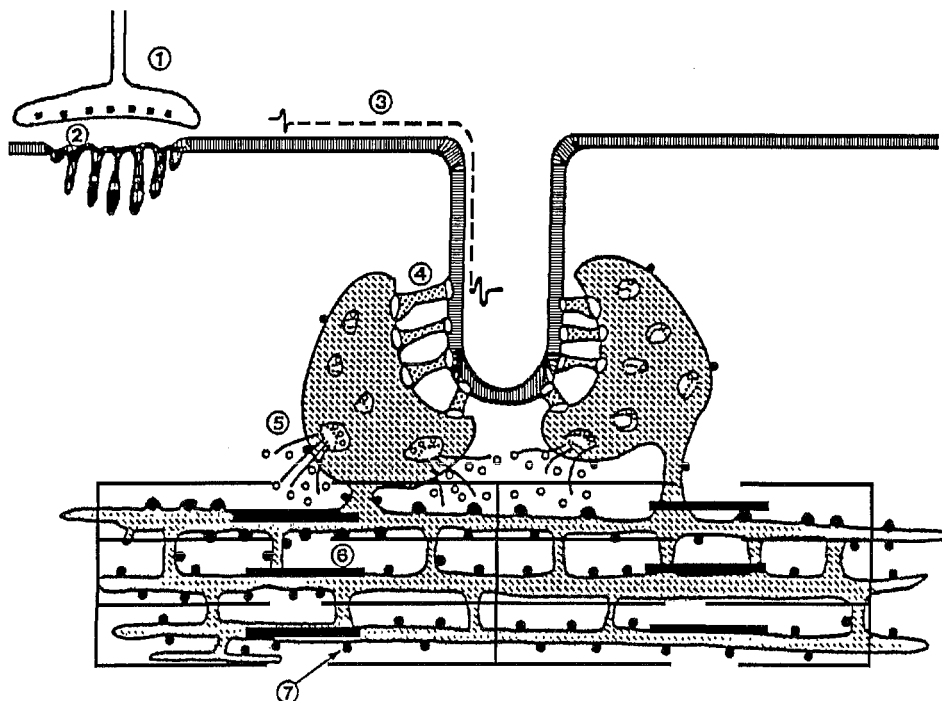


Figure I.2. : Couplage excitation-contraction d'après Nelson et al., 1988. 1) Plaque motrice, 2) Libération d'Acétylcholine dans la fente synaptique, 3) Propagation du potentiel d'action dans un tubule T, 4) Protéines "pied" et RYR, 5) Libération de Ca^{2+} par les citernes terminales du RS, 6) Interaction Actine-Myosine, 7) Recaptage du Ca^{2+} par la pompe ATPase dépendante.

I.1.2. Rappels physiologiques

I.1.2.1. Organisation de la cellule squelettique

Le muscle squelettique est formé de myocytes qui sont de grandes cellules cylindriques allongées, de diamètre important et multinucléées. Chaque myocyte est composé de structures cytoplasmiques protéiques contractiles, les myofilaments regroupés en myofibrilles. Les myofibrilles sont formées d'une série d'unités répétitives, limitées à chaque extrémité par une strie Z. Ces unités répétitives sont appelées sarcomères, chaque sarcomère étant constitué d'un faisceau de myofilaments. Les myofilaments sont de deux types : épais de myosine et fin d'actine. Entourant ces éléments contractiles, le myocyte possède des réseaux membranaires essentiels au maintien de son homéostasie et à l'entretien du cycle excitation-contraction-relaxation.

La membrane cellulaire, ou sarcolemme, s'invagine au niveau de chaque sarcomère pour former un réseau membranaire de tubules transverses (systèmes T) atteignant chaque myofibrille. Ce réseau transverse est en contact avec un réseau membranaire longitudinal qui enlace les myofibrilles, le RS, lieu de stockage du calcium intracellulaire. La triade, support structural clé du couplage excitation-contraction, est l'association d'un système T et de deux citernes terminales du RS (Figure I.1).

Le système T est ainsi en relation étroite avec le RS, et les deux membranes sont réunies par des structures périodiques appelées "pieds" (Figure I.2). Ces dernières possèdent une organisation tétramérique à chacune de leurs extrémités :

- le récepteur aux dihydropyridines (du nom d'un calcium-bloqueur à haute affinité pour ces récepteurs) : coté système T, les quatre protéines du "pied" correspondent à un récepteur sensible au potentiel de plaque qui commande les mouvements d'un canal calcique lent. Le calcium extracellulaire n'est pas nécessaire à la contraction du muscle squelettique et on admet que ce sont les propriétés du capteur de voltage qui sont essentielles dans l'activation de la citerne sarcoplasmique avoisinante [Baillet 1992].
- le récepteur à la ryanodine : coté RS, le complexe tétramérique (4 sous-unités identiques de 563 kD) commande un autre canal calcique lent responsable du relargage du Ca^{2+} dans le cytoplasme lors de la contraction musculaire. Ce récepteur fixe électivement la ryanodine (alcaloïde végétal), ce qui permet de le caractériser.

I.1.2.2. Le couplage excitation-contraction (Figure I.2)

L'excitation du muscle est le signal de départ de la contraction musculaire. Il se produit une libération de neurotransmetteur, l'acétylcholine, au niveau de la jonction neuromusculaire. L'acétylcholine fixée sur une sous-unité de son récepteur, provoque l'ouverture d'un canal ionique induisant un changement brutal du potentiel membranaire de plusieurs millivolts. Cette dépolarisation permet le développement d'un potentiel d'action qui se propage le long de la surface de la membrane musculaire jusqu'à la membrane des tubules T.

L'arrivée du potentiel d'action au niveau des triades est à l'origine de la libération de Ca^{2+} hors des citernes terminales du RS à travers le canal calcique couplé au RYR. La concentration cytoplasmique en Ca^{2+} libre s'élève alors bien au-dessus de la concentration dans la cellule au repos qui était inférieure au micromolaire. Les ions Ca^{2+} diffusent jusqu'aux myofilaments et se fixent sur la troponine permettant ainsi l'interaction actine-myosine. La contraction résulte du glissement des filaments les uns par rapport aux autres.

La relaxation de la fibre est assurée par les nombreuses molécules d'ATPase-calcium qui tapissent la paroi du RS et qui permettent au RS de recapter le calcium contre un gradient de concentration. Ces protéines utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour accumuler le Ca^{2+} à l'intérieur du RS.

Dans la fibre musculaire, contraction et relaxation sont donc gouvernées par les oscillations du niveau de Ca^{2+} intracellulaire. Un bon équilibre entre la libération et la recapture du calcium par le RS assure un fonctionnement normal de la cellule musculaire.

I.2. Etiopathogénie

Tout dérèglement de la thermorégulation, soit par thermogénèse excessive, soit par thermolyse insuffisante, implique forcément le muscle squelettique, et peut évoluer de manière irréversible comme c'est parfois le cas lors des crises d'HM.

De nombreuses hypothèses sur l'étiopathogénie de l'HM ont mis en cause, à des degrés divers, les différents constituants de la cellule musculaire squelettique : sarcolemme, mitochondries, réticulum sarcoplasmique, couplage excitation-contraction [Britt 1987]. La participation d'autres tissus au cours d'une crise d'HM (système nerveux central, système sympathique, myocarde...) est certes réelle mais secondaire à l'atteinte musculaire [Gronert 1988].

L'élévation de la température se produisant au cours de la crise d'HM est due à l'association de plusieurs phénomènes [Heffron 1988] :

- hydrolyse rapide des composés phosphatés de haute énergie par l'actomyosine ATPase pendant la contraction musculaire, par l'ATPase du RS pendant la relaxation,
- neutralisation des ions H⁺ produits dans les conditions d'acidose respiratoire et métabolique,
- énergie libre libérée mais non recaptée comme l'ATP pendant l'accélération du métabolisme aérobie et anaérobie qui se produit pendant la crise,
- cycle futile du fructose-1, 6-bisphosphate en fructose-6-phosphate.

I.2.1. HM et [Ca²⁺]

En fait, le facteur déclenchant de la crise d'HM est lié à une brusque élévation de la concentration intracytosolique de Ca²⁺ (> 5 10⁻⁷ M) [Lopez 1985]. La cascade des événements lui faisant suite est connue [Heffron 1988] : l'activation permanente de la myosine ATPase (d'où contracture et chaleur) accroît brutalement la demande énergétique, donc le métabolisme des voies aéro et anaérobies (d'où production de CO₂ et de lactate). L'emballement de la machinerie contractile détourne la fourniture énergétique des autres sites consommateurs d'ATP, principalement les pompes membranaires. Le Ca²⁺ ne peut plus être capté activement par la pompe Ca²⁺ ATP dépendante du réticulum sarcoplasmique, le sarcolemme devient perméable, inondant le secteur extracellulaire de potassium, protons, lactate et de grosses molécules comme la myoglobine et la créatine kinase. L'effet bénéfique du dantrolène passe par l'inhibition dose-dépendante de la libération de Ca²⁺ hors du RS [Lopez 1992].

Un défaut de régulation des mouvements du Ca^{2+} par le RS a d'emblée été suspecté comme principale origine à l'HM [Nelson 1987]. Des études sur modèle porcin ont montré que le RS des animaux porteurs du trait HMS apparaît plus sensible à la caféine, au Ca^{2+} et au Mg^{2+} que celui des animaux HM-négatifs (HMN) : la libération de Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} (calcium-induced calcium release) y est plus précoce et plus intense. De plus, la libération de Ca^{2+} hors des vésicules de RS est significativement augmentée par les agents halogénés [Mickelson 1986].

Le calcium transforme les membranes de phospholipides de l'état liquide à l'état solide en libérant de la chaleur. *In vitro*, une étude a montré qu'une concentration de $120 \mu\text{M}$ de calcium dans le milieu de vésicules membranaires induit une production importante de chaleur. A cette concentration de Ca^{2+} , les membranes lipidiques subissent une transition de phase et le Ca^{2+} produit de la chaleur lorsqu'il se lie aux membranes lipidiques. La transition de phase lipidique serait une des sources de chaleur et elle pourrait déclencher un état hypermétabolique en élevant la température des membranes cellulaires [Ueda 1994].

I.2.2. Origines

Il restait alors à identifier la structure membranaire la plus vraisemblablement impliquée dans la genèse de l'HM : le récepteur à la ryanodine [Mickelson 1988]. En effet, comme la ryanodine module la libération de Ca^{2+} hors du RS, il a été démontré que son récepteur, isolé et purifié, possédait toutes les propriétés d'un canal calcique [Lai 1988].

Dans le RS de porcs HMS, la ryanodine a une plus grande affinité pour son récepteur en présence de Ca^{2+} entraînant un temps d'ouverture plus long du canal calcique ce qui pourrait expliquer le taux plus élevé que la normale de libération du calcium par le RS des animaux HMS [Mickelson 1988].

Le mode d'action moléculaire de l'halothane reste encore inconnu puisque la contracture musculaire induite par l'halothane ne semble pas due, initialement, à une dépolarisation membranaire [Iaizzo 1989a]. Une étude vient de montrer que l'halothane augmenterait notablement dans le muscle HMS l'état probable d'ouverture et de la conductance du canal calcique lié au récepteur à la ryanodine [Nelson 1992].

I.2.3. Autres hypothèses

La question d'une altération de la perméabilité membranaire du sarcolemme et/ou du RS a fait l'objet de nombreux travaux et les résultats sont très controversés. Aucun défaut de la mobilité des lipides membranaires du sarcolemme, des systèmes T et de RS isolés de porcs HMS n'a été détecté par résonance paramagnétique électronique [Ervasti 1989b]. De même aucune différence de la fluidité de la membrane cellulaire des globules rouges [Halsall 1992] ni de celle des lymphocytes [Rock 1993] humains n'a été mise en évidence entre sujets HMS et HMN. En revanche, une anomalie de la fluidité des membranes du RS [Rock 1990] et des lymphocytes [Rock 1993] a été mise en évidence chez le porc et un défaut généralisé des membranes a été évoqué à la suite de l'étude de la libération de Ca^{2+} intracellulaire induite par l'halothane et de la perméabilité au Ca^{2+} des membranes plasmiques des plaquettes chez des sujets HMS [Fink 1992].

L'HM a aussi été associée à un défaut de la β -oxydation des acides gras et à une activité accrue de la phospholipase A_2 qui augmente la concentration des triglycérides cytosoliques et celle des acides gras insaturés [Fletcher 1986], abaissant ainsi le seuil de libération du calcium [Fletcher 1990] et augmentant la peroxydation lipidique. L'augmentation de l'activité des radicaux libres dans le tissu des porcs HMS [Duthie 1992] produits par peroxydation des n-6 acides gras ne provient pas d'une déficience des antioxydants ni des enzymes antioxydantes mais peut être une conséquence de l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Une concentration de $0.1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} est suffisante pour accélérer le taux de peroxydation lipidique *in vitro* et aussi pour activer la phospholipase A_2 , augmentant ainsi la libération d'hydroperoxydes lipidiques et d'acides gras libres, substrats des réactions de radicaux libres.

Au niveau lipidique, des études chez le porc [Fletcher 1988, Mickelson 1986] et chez l'homme [Fletcher 1989] ont montré qu'il n'y avait aucune différence dans les taux de cholestérol, les taux de triglycérides ou les valeurs du phosphore lipidique total et que la distribution des phospholipides et des acides gras libres ne différait pas entre les muscles HMN et HMS. Chez le porc il n'a pas été trouvé de différence entre HMS et HMN au niveau des acides gras liés aux triglycérides, en revanche chez l'homme le taux de ces acides gras est plus bas chez les HMS. Cela pourrait provenir d'une augmentation de l'activité de la triglycéride lipase entraînant ainsi un catabolisme accru des triglycérides [Fletcher 1989] et expliquant donc l'augmentation des acides gras libres mentionnée plus haut. Il y a une plus faible proportion d'acide linoléique dans les phospholipides et les lipides neutres des porcs HMS indiquant une peroxydation ou un métabolisme accru. L'augmentation des acides oléique et arachidonique des porcs HMS indique que l'activité de désaturation est élevée dans toutes les classes de lipides [Duthie 1992].

Une autre hypothèse pouvant expliquer le défaut de libération du Ca^{2+} lié à la crise d'HM est un déficit d'activité du RS en inositol 1,4,5-trisphosphate phosphatase (InsP₃5-ase), enzyme qui métabolise l'inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) en inositol 1,4-bisphosphate [Foster 1989a]. Cette étude a en effet montré une activité de l'InsP₃5-ase liée à la membrane plasmique du RS plus faible dans les muscles de porcs HMS ainsi qu'une concentration d'InsP₃ plus élevée dans ces mêmes muscles [Foster 1989a, Scholz 1993]. Le cycle de l'InsP₃ est le système second messenger le plus important dans la régulation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. L'InsP₃ est impliqué dans la régulation de la libération du calcium du RS : il induit la libération du calcium des vésicules de la membrane du RS et active les canaux calciques du système T.

La stimulation des récepteurs de la sérotonine (5-HT) induit une HM chez les porcs génétiquement prédisposés. De plus le taux de 5-HT mesuré dans le plasma au cours d'une crise induite par l'halothane chez des porcs HMS a montré que ce taux augmente avec d'autres paramètres pendant cette crise [Gerdes 1992]. Donc la sérotonine pourrait être impliquée dans le mécanisme d'HM induite par les anesthésiques volatils car les muscles squelettiques possèdent des récepteurs à la 5-HT spécifiques et il a été montré un lien entre l'activation de ces récepteurs et l'augmentation de l'hydrolyse du cycle de l'inositol : l'induction de l'hyperactivité musculaire par les agonistes des récepteurs à la 5-HT pourrait être due à une augmentation de la formation d'InsP₃. Mais le rôle éventuel de la 5-HT a été récemment remis en cause [Löscher 1994] puisque l'administration d'antagonistes des récepteurs de la 5-HT chez des porcs HMS avant ou après inhalation d'halothane ne modifiait en rien l'apparition de la crise d'HM.

D'autres structures cellulaires pourraient aussi avoir un rôle dans l'étiopathogénie de l'HM. En effet, chez le porc HMS, l'activité en acétylcholinestérase du sarcolemme est augmentée [Mickelson 1987], la fixation des dihydropyridines sur leur récepteur est réduite [Ervasti 1989a]. Il est possible que la crise d'HM soit en fait la manifestation de tous ces dysfonctionnements. Cela pourrait appuyer l'hypothèse génétique que l'HM ne soit pas liée à une seule anomalie.



Figure I.3. Arbre généalogique d'une famille HMS

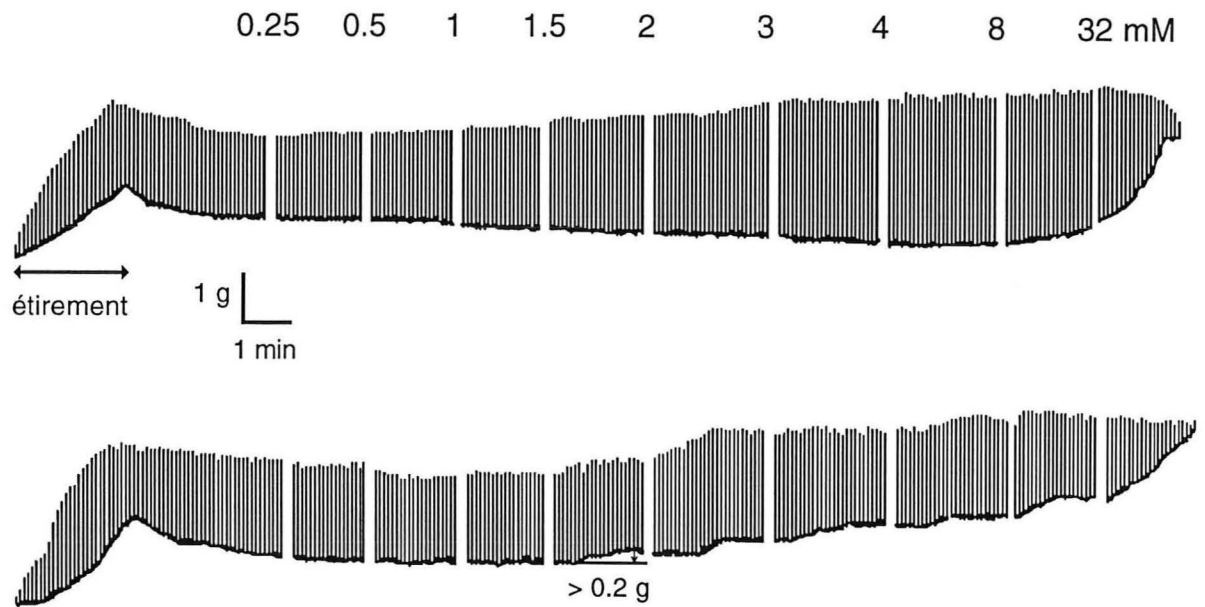
I.3. Tests de dépistage

Le caractère familial de la susceptibilité à l'HM impose évidemment un dépistage pour les patients ayant eu un épisode évoquant cliniquement l'HM et pour les membres de leur famille. Pour la famille dont l'arbre généalogique est représenté figure I.3, tout a commencé par l'individu III.12, un jeune garçon, qui est décédé d'une crise d'HM au cours d'une anesthésie générale. Une fois le diagnostic de crise d'HM confirmé, ses parents (II.4 et II.5) ont été dépistés par un test de contracture *in vitro*, et chose très rare, le père est HMS et la mère HM-équivoque (HME). Leurs autres enfants (III.13, III.14 et III.15) ont aussi été dépistés : le garçon est HME et les filles sont respectivement HMS et HMN. Sur les 15 personnes de la fratrie qui ont été dépistées, 8 sont HMS, 4 sont HME et 3 HMN. On peut aussi supposer que l'individu II.2 est HMS puisque ses deux enfants (III.4 et III.5) le sont. Aucun des individus de la génération IV n'a été dépisté car ce sont tous de jeunes enfants. Bien que chaque membre de cette famille ait eu une étude génétique à partir de l'ADN de cellules sanguines, aucune liaison n'a pu être établie entre une anomalie génétique connue et le trait HM de cette famille.

L'affinement des méthodes de dépistage dotées d'un caractère reproductible, sensible, spécifique, atraumatique et rentable constitue un autre axe majeur de recherche sur l'HM.

De nombreux tests paracliniques ont été proposés, évalués, mais pour la plupart abandonnés en raison d'une trop faible prédiction du trait HMS [Ørding 1988]. Des tests sanguins (dosage de créatine kinase), électrophysiologiques (vitesse de relaxation musculaire) ou histologiques ne permettent pas de distinguer les sujets à risque des autres. Le dosage du Ca^{2+} intralymphocytaire en présence d'halothane a aussi été proposé [Klip 1987] mais d'autres auteurs n'ont pu confirmer les résultats initiaux [Ørding 1990]. L'analyse du trait génétique HMS sera évidemment le moyen le plus sûr de dépistage. Cependant, l'expression phénotypique variable de l'HM, probablement liée à une hétérogénéité génotypique, ne permet pas de recourir à cette approche de manière usuelle. En fait, le seul test de dépistage actuellement reconnu demeure le test de contracture *in vitro*, proposé il y a plus de 20 ans par Kalow [1970] et Ellis [1971].

Caféine



Halothane

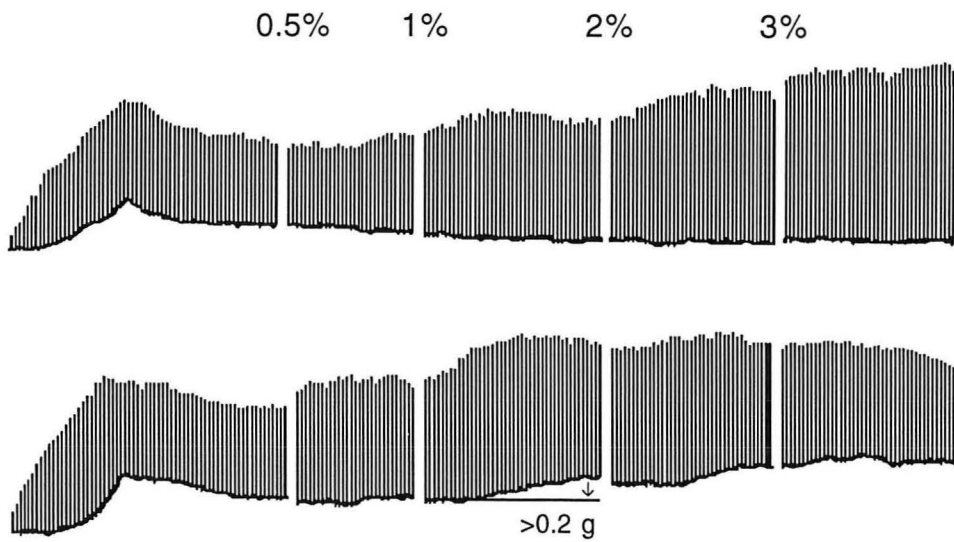


Figure I.4. Tracé du test de contracture en présence de caféine et d'halothane. Le sujet est HMS quand une contracture ≥ 0.2 g apparaît pour des concentrations faibles de caféine et d'halothane, et HMN dans le cas contraire.

I.3.1. Test de contracture *in vitro*

Ce test se pratique dans trois centres de dépistage de l'HM en France : Grenoble, Lille et Marseille. Le laboratoire de dépistage de Grenoble est installé au sein du département d'anesthésie-réanimation du Centre Hospitalier Albert Michallon. Le muscle choisi est le *vastus medialis* de la cuisse, prélevé sous anesthésie loco-régionale. Les fragments musculaires (15 à 25 mm de long) de ce muscle sont conservés à température ambiante dans une solution de Krebs-Ringer de pH = 7.4. Le test soumet ces fragments à des concentrations croissantes de caféine ou d'halothane sous stimulation électrique répétée (0.2 Hz). Le matériel comporte une chambre de Krebs-Ringer thermostatée et carbogénée, équipée de deux électrodes de platine reliées à un stimulateur. L'étirement préalable du fragment musculaire placé dans cette chambre est ajusté pour obtenir une réponse (ou twitch) ≥ 2 g. Une source calibrée d'halothane ou de caféine alimente en permanence la chambre, les concentrations passant de 0.5 à 3% pour l'halothane, et de 0.25 à 32 mM pour la caféine. La lecture des résultats s'effectue sur la variation progressive de la tension résiduelle du fragment pour détecter une contracture, témoin d'une sensibilité précoce à l'halothane et/ou à la caféine (Figure I.4). Le sujet est classé HMS (test positif) quand une contracture ≥ 0.2 g apparaît pour des concentrations d'halothane $\leq 2\%$ et de caféine ≤ 2 mM. Le test est dit équivoque (HME) quand la contracture n'est déclenchée qu'avec une seule substance, et négatif (HMN) dans tous les autres cas. Ces recommandations sont élaborées par le groupe européen travaillant sur l'HM [EMHG 1984].

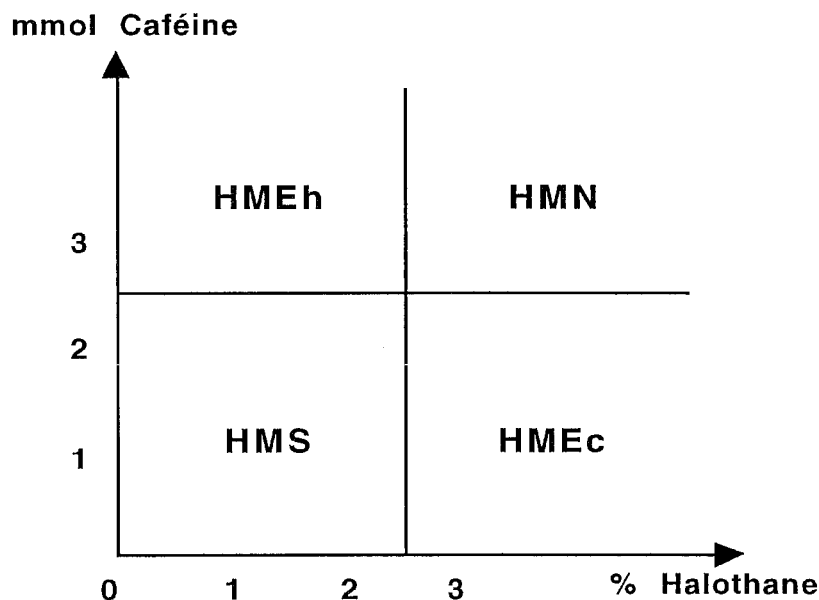


Figure I.5. Répartition des patients biopsiés selon la classification du EMHG.

Cependant, un certain nombre d'arguments invitent à relativiser l'apport décisionnel de ce test. Tout d'abord, il s'agit d'un examen invasif, nécessitant une biopsie chirurgicale musculaire. Or il n'est pas facile d'en justifier le besoin notamment quand le diagnostic d'HM est cliniquement douteux. Par ailleurs, depuis des années, un effort est accompli pour standardiser ce test parmi les différents centres de dépistage, sans toutefois parvenir à un protocole commun entre américains [Larach 1989] et européens [EMHG 1984]. Les résultats du test sont en partie dépendants du type de muscle choisi [Iaizzo 1989b]. De plus, il a été montré que de nombreuses affections neuro-musculaires pouvaient présenter un test de contracture positif [Heiman-Patterson 1988, Lehmann-Horn 1990, Tagaki 1983]. Or, la myopathie à core centraux reste la seule affection étroitement liée à l'HM [Brownell 1988], peut-être en raison d'une localisation génétique voisine [Kausch 1990]. Sur la totalité des patients diagnostiqués par ce test, seulement 4 cas de faux négatifs ont été publiés [Isaacs 1993] et trois d'entre eux sont discutables. Enfin, plus de 30% des sujets présumés HMN ont présenté un test positif en présence de 3% d'halothane et 2 mM de caféine [Larach 1992]. Il apparaît donc que le test de contracture *in vitro*, outre son caractère invasif, souffre d'une mauvaise standardisation entre centres de dépistage et d'une trop grande sensibilité (ou d'une trop faible spécificité), dont une des conséquences serait d'affecter le résultat des études de liaison génétique [MacKenzie 1991].

Solutions de Krebs-Ringer

Solution mère :

- KH ₂ PO ₄	8.1 g
- CaCl ₂	14.14 g
- KCl	12.67 g
- NaCl	345.09 g
- MgSO ₄ , 7H ₂ O	25.26 g
- Eau distillée	5 litres

Solution fille :

- Glucose	9.95 g
- NaHCO ₃	10.5 g
- Solution mère	500 ml
- Eau distillée	qsp 5 l

Composition chimique de la solution fille :

- NaCl = 118.1 mmol/l
- KCl = 3.4 mmol/l
- MgSO ₄ = 0.8 mmol/l
- KH ₂ PO ₄ = 1.2 mmol/l
- Glucose = 11.1 mmol/l
- NaHCO ₃ = 25 mmol/l
- CaCl ₂ = 2.5 mmol/l
pH = 7.4

I.3.2. Test génétique

Depuis plusieurs années, le diagnostic génétique des myopathies et apparentés, basé sur l'obtention de sondes moléculaires spécifiques et réalisable à partir d'un simple prélèvement sanguin, suscite beaucoup d'espoir. Pour l'HM, les recherches consistent à analyser un panel de familles étudiées par biopsies afin de déterminer les meilleurs marqueurs génétiques et d'essayer d'établir des corrélations entre le statut phénotypique des individus et leur génotype [MacKenzie 1991].

Pour une famille donnée, une anomalie génétique connue est recherchée. Lorsque celle-ci est retrouvée dans un certain nombre d'individus de la famille, une liaison peut-être établie entre le trait HMS et cette anomalie et ainsi tous les nouveaux sujets testés porteurs de cette anomalie seront classés HMS. Pour les individus ne portant pas cette anomalie, leur statut ne pourra être déduit par le test génétique et un test de dépistage *in vitro* sera alors effectué pour le définir.

La génétique moléculaire reste donc une voie de recherche vers un test non invasif et reproductible mais met en évidence l'hétérogénéité du syndrome HM.

I.3.3. SRM ^{31}P *in vivo*

L'étude par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du phosphore 31 (SRM ^{31}P) de sujets susceptibles à l'HM répond à deux objectifs : évaluer une méthode de dépistage non invasive et identifier biochimiquement un ou plusieurs marqueurs du métabolisme musculaire. Comme les données de la génétique laissent supposer un dérèglement permanent des mouvements de Ca^{2+} chez les sujets HMS, dont l'expression ne serait bien sûr exacerbée qu'en présence des produits déclenchants, la détection d'anomalies musculaires est à priori envisageable en dehors de tout épisode aigu.

Quelques arguments plaident en effet pour une trace anormale, visible par SRM, dans le métabolisme énergétique des muscles HMS puisque les mouvements cellulaires du Ca^{2+} sont étroitement liés au métabolisme énergétique [Martonosi 1984]. En présence d'halothane et de caféine, l'emballement de l'activité ATPasique Ca^{2+} -dépendante de muscles de porcs HMS s'est traduite par un effondrement du pic de la PCr et une augmentation du Pi [Foster 1989b]. Au décours d'un effort brutal et intense, une acidose marquée a été retrouvée dans le muscle de sujets HMS [Allsop 1991]. En revanche, aucune différence n'a été mise en évidence dans l'analyse biochimique sur biopsie de métabolites musculaires entre sujets HMS et HMN [Verburg 1986].

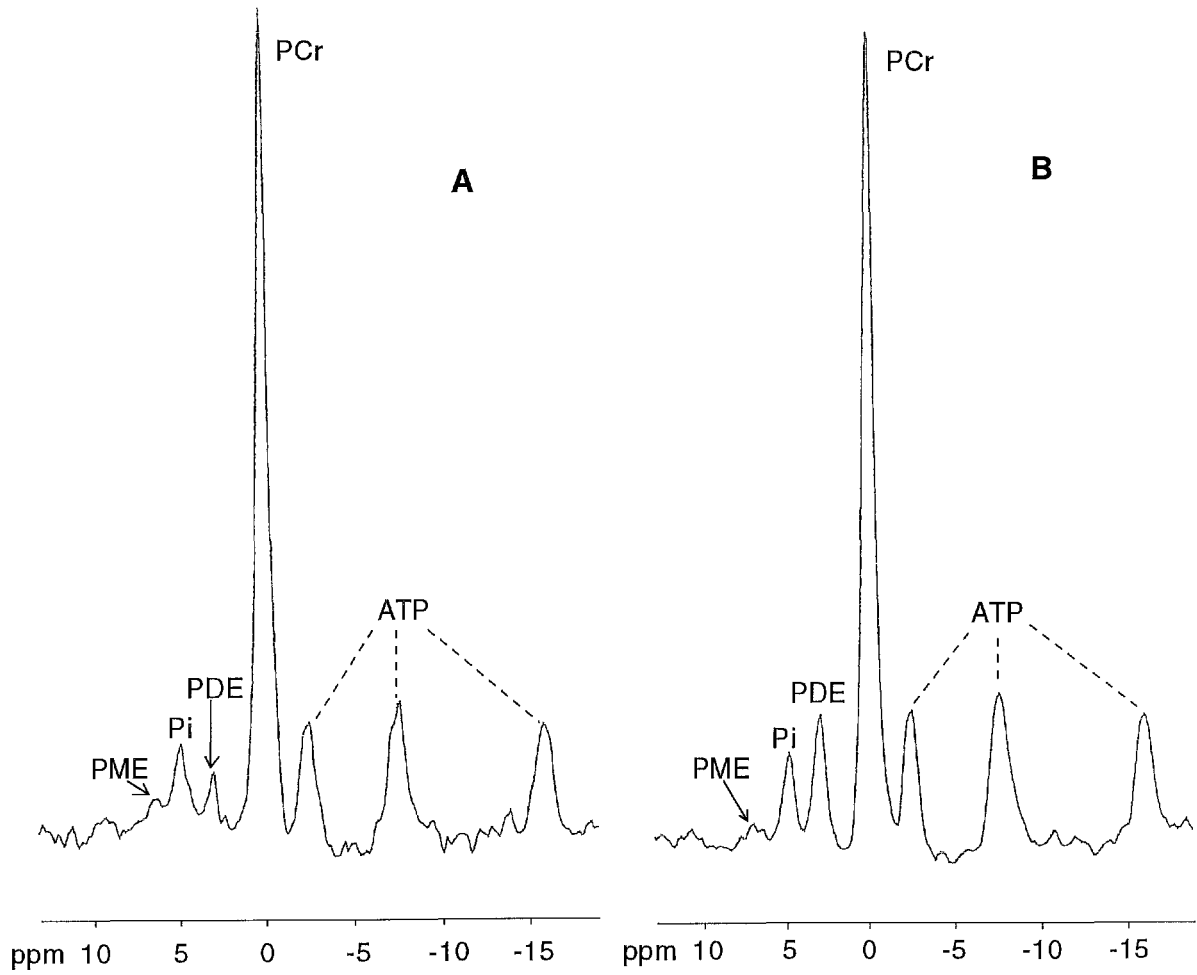


Figure I.6. Spectres RMN ^{31}P *in vivo* d'un patient HMN (A) et d'un patient HMS (B).

Peu d'équipes ont publié des résultats concernant la détection par SRM du trait HMS. L'équipe de Chance a observé chez les sujets HMS un rapport Pi/PCr plus élevé au repos et une resynthèse de la PCr plus lente en récupération. Aucune anomalie n'a été détectée au cours de l'effort [Olgin 1988, Olgin 1991]. A l'inverse, deux autres équipes ont rapporté la présence d'une acidose intracellulaire plus marquée chez les sujets HMS en fin d'effort [Laschuk 1987, Kozak-Reiss 1988]. A l'évidence, des différences notables de méthodologie (protocole d'effort, expression des résultats) nuisent à la qualité des résultats attendus de la SRM ^{31}P comme outil de dépistage.

Un autre problème soulevé par ce type d'étude concerne l'approche probabiliste requise pour distinguer deux populations d'après un caractère qualitatif. En effet, la comparaison des valeurs observées entre deux groupes, l'un HMS, l'autre HMN, par les tests statistiques habituels est nécessaire mais parfaitement insuffisante. Pour prédire le caractère HMS ou HMN d'un individu, seule une analyse discriminante est valable [Smith 1988]. La comparaison des deux groupes (échantillon d'apprentissage) sert à identifier des paramètres sensibles. Puis, chaque paramètre est affecté d'un poids d'après les données d'une régression multiple menée pas à pas. Un score est alors établi permettant (ou non) de distinguer les deux populations. Un échantillon d'essai servira à valider (ou non) le score. Seuls, deux travaux publiés [Olgin 1991 et Payen 1993] ont suivi cette procédure.

Dans le laboratoire, nous avons engagé depuis 1989 un programme de recherche sur le dépistage de l'HM par SRM. L'examen SRM est effectué la veille de la biopsie. Les muscles des deux mollets sont étudiés par SRM pour tous les sujets adressés pour biopsie musculaire au cours de la séquence classique : repos, exercice, récupération. Dès les premiers examens, il a été remarqué que la période de repos était caractérisée par la présence d'un pic anormalement visible situé dans la région des phosphodiesteres (PDE) chez des sujets HMS (Figure I.6) [Payen 1991]. Cette anomalie n'avait pas été décrite dans ce cadre-là. Seule l'augmentation du rapport phosphate inorganique/phosphocréatine (Pi/PCr) au repos était rapportée chez des sujets HMS [Olgin 1988]. Le rapport PDE/PCr, mesuré sur plusieurs patients ayant bénéficié du test SRM, est significativement plus élevé chez les sujets HMS. A partir de ces deux rapports, il devenait possible d'évaluer la SRM ^{31}P comme outil de dépistage du trait HMS en établissant un score d'anomalies musculaires déterminé sur un échantillon d'apprentissage [Payen 1993]. Pour un score de SRM < 1.5 les patients sont classés HMS, pour un score ≥ 1.65 les patients sont classés HMN. Pour un score intermédiaire, une conclusion finale ne peut pas être donnée uniquement par le test SRM ; il est nécessaire d'attendre le résultat du test de contracture *in vitro* pour donner une réponse définitive. A l'heure actuelle, la spectroscopie ^{31}P pourrait être un outil non invasif pour le diagnostic de la susceptibilité HM, en tant que moyen d'orientation avant de recourir à d'autres techniques plus agressives (biopsie) ou qui nécessitent des sujets informatifs (analyse génétique).

I.3.4. Analyse histologique

Lors de la réalisation de chaque biopsie, un échantillon de muscle est destiné à une étude complète dans le laboratoire de pathologie cellulaire. Une microscopie photonique et une microscopie électronique sont systématiquement réalisées. Des réactions histo-enzymatiques et des examens morphométriques sont pratiqués pour différencier, quantifier et analyser les fibres de type I et II. Une immunofluorescence par immuns-sérums anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM, anti-C3 et anti-fibrinogène termine l'examen.

A la suite de ces examens, les images pathologiques les plus fréquemment observées chez les patients HMS sont hypertrophie et atrophie des fibres musculaires, internalisation nucléaire et nécrose. Ces 4 anomalies sont simultanément associées chez environ 30% des patients HMS mais chez aucun HME ni HMN. Trois lésions histologiques sont observées chez 55% des HMS, 18% des HME et seulement 2% des HMN. En ajoutant à cela les variations du diamètre moyen des fibres, on peut considérer les biopsies comme normales chez seulement 5% des HMS, 18% des HME et 45% des HMN [Mézin 1995].

Mais en fait, comme pour la majorité des myopathies, il n'existe pas d'atteinte anatomopathologique spécifique à l'HM. En plus des anomalies citées ci-dessus, deux autres aspects pathologiques sont plus particulièrement retrouvés chez les familles HMS : 1) aspect de fibres mitées (Moth-eaten fibres), 2) "cores" c'est à dire zones de pâleur correspondant à des parties de myofibrilles dépourvues de mitochondries [Ørding 1988].

I.3.5. Test à la ryanodine

Le test de contracture *in vitro* à la ryanodine réalisé dans les conditions habituelles du protocole de l'EMHG se présente comme un candidat potentiel à l'obtention d'un examen spécifique de l'HM. L'addition du test à la ryanodine à la méthode courante du test de contracture *in vitro* pourrait réduire le nombre de patients classés HME et améliorer ainsi le diagnostic de l'HM. Cependant, compte tenu de la toxicité de la ryanodine à forte dose sur la cellule musculaire striée, l'administration en bolus paraît préférable aux doses croissantes. Une étude réalisée sur biopsies musculaires humaines a montré qu'une contracture était déclenchée plus précocement sur les lambeaux HMS que sur ceux HMN, quelle que soit la dose de ryanodine présente dans le bain [Wappler 1994].

Deuxième partie :

Halothane

II.1. Introduction

L'halothane est un agent anesthésique général halogéné qui a été introduit en clinique en 1956 et s'est rapidement imposé dans la pratique anesthésique. Les autres agents halogénés actuellement commercialisés sont l'enflurane, l'isoflurane, le desflurane et le sévoflurane.

Le mode d'action des anesthésiques généraux est encore imparfaitement expliqué. Il semble de plus en plus évident que :

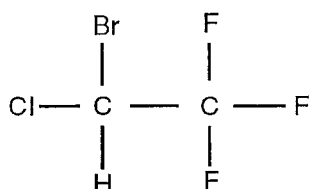
- l'activité anesthésique dépend non seulement des propriétés lipophiles et amphiphiles d'une substance mais encore d'autres particularités moléculaires telles que composition chimique, poids moléculaire, configuration et stéréo-spécificité,
- les concentrations anesthésiques sont à l'origine de variations de configuration des protéines des membranes cellulaires plutôt que des lipides de ces membranes,
- les anesthésiques troublent la mobilité des électrons, ce qui pourrait induire ces variations de configuration des protéines fonctionnelles,
- les interactions entre agents anesthésiques et protéines fonctionnelles sont souvent de type compétitif avec un ligand endogène,
- les anesthésiques n'agissent pas sur une structure spécifique du cerveau mais sur l'ensemble des synapses excitatrices et inhibitrices du système nerveux central.

Actuellement, la majorité des auteurs défendent l'hypothèse suivante [Schwander 1989] : selon ses propres caractéristiques de distribution et de fixation, chaque agent anesthésique par inhalation agirait en occupant des cibles hydrophobes de protéines membranaires et d'autres protéines sensibles. Ainsi, chaque agent anesthésique en inhibant la fonction normale de certaines protéines produit non seulement un effet anesthésique mais également toute une variété d'effets indésirables. Reste toujours à savoir si l'agent anesthésique agit directement sur ces cibles protéiques ou secondairement, par l'intermédiaire de ses actions sur les lipides membranaires par exemple en les fluidifiant ou en changeant leur structure, en augmentant la perméabilité ou la surface et l'épaisseur des membranes lipidiques.

L'identification de telles cibles protéiques pourrait permettre de synthétiser de nouveaux agents anesthésiques beaucoup plus spécifiques que ceux existants. Pour ce faire, il ne faut pas seulement étudier des analogues et des modèles de l'anesthésie générale, mais décrire quantitativement pour chaque agent les effets de l'anesthésie sur les fonctions neurologiques centrales et périphériques, en les analysant comparativement avec le sommeil physiologique et les autres états de perte de conscience [Schwander 1989].

II.1.1. Structure chimique de l'halothane

$C_2HBrClF_3$ (C 12.17%, H 0.51%, Br 40.48%, Cl 17.96%, F 28.87%)



Poids moléculaire : 197.39 g

Numéro CAS : 151-67-7

Noms chimiques : **2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroéthane** ou bromochlorotrifluoroéthane ou 1,1,1-trifluoro-2,2-chloro-bromoéthane ou Fluothane ou Rhodialothan.

II.1.2. Propriétés physicochimiques

[François 1985, Marshall 1990, Firestone 1988, Martindale 1989]

L'halothane est un liquide incolore, limpide, lourd, mobile, très volatile, d'odeur douceâtre rappelant le chloroforme. Il est miscible dans l'alcool absolu, les graisses et les huiles essentielles, l'éther et autres solvants gras. Il est soluble dans l'eau à 0.345%. Il doit être conservé entre 8 et 15 °C dans un récipient hermétiquement fermé, à l'abri de la lumière. Il peut être stabilisé par addition de 0.01% de thymol. L'halothane est absorbé par le caoutchouc et les matières plastiques. Il attaque la majorité des métaux en présence d'humidité (sauf le chrome, le nickel et le titane) mais les résines synthétiques, le polyéthylène, le nylon, la cellulose et le Téflon ne sont pas attaqués. Inexplosif et non inflammable jusqu'à 6.5% en oxygène hyperbare à 4 Atm, il est légèrement décomposé par la chaux sodée mais peut être utilisé en circuit filtre. Il se décompose au contact d'une flamme avec libération de brome.

Constantes physicochimiques :

Densité = 1.86 MAC = 0.75%

Point d'ébullition à 760 mm Hg : 50.2 °C

Coefficient de partage eau/gaz à 37 °C = 0.7

Coefficient de partage sang/gaz à 37 °C = 2.3

Coefficient de partage huile/gaz à 37 °C = 224

Pression de vapeur saturante à 20 °C = 243 mm Hg

Concentration de vapeur maximale à 20 °C = 32%

La MAC est la concentration alvéolaire minimale qui inhibe les réactions motrices à une incision cutanée chez 50% des patients. Le coefficient de partage sang/gaz est inversement proportionnel à la rapidité d'induction, le coefficient de partage huile/gaz est directement proportionnel à la puissance anesthésique.

II.2. Pharmacocinétique de l'halothane

II.2.1. Absorption

La concentration alvéolaire dépend d'une part de l'apport d'anesthésique et d'autre part de la quantité qui est absorbée dans le sang. Les facteurs qui déterminent l'apport d'anesthésique aux alvéoles sont la concentration inspirée en agent anesthésique et l'importance de la ventilation alvéolaire. Les facteurs qui déterminent l'absorption par le sang de l'agent anesthésique sont sa solubilité dans le sang, le débit cardiaque et la différence entre la concentration veineuse et le taux alvéolaire de l'anesthésique. Trois paramètres essentiels déterminent la rapidité de l'absorption de la quantité nécessaire d'un anesthésique par inhalation : 2 paramètres physiologiques qui peuvent être influencés de manière variable par les différents anesthésiques et par l'état du patient (volume respiratoire et débit cardiaque) et un paramètre physicochimique lié à l'anesthésique utilisé (solubilité) [Schwander 1989].

L'anesthésique par inhalation pénètre avec le mélange gazeux porteur inspiré par les poumons dont le volume résiduel est progressivement remplacé par le mélange anesthésique et de là diffuse à travers la membrane alvéolaire pour être finalement absorbé par le sang artériel. Ainsi, plus le volume/minute est élevé, plus la quantité nécessaire d'anesthésique sera rapidement absorbée [Schwander 1989]. La baisse du débit cardiaque et la faible solubilité de l'halothane dans le sang sont des facteurs d'accélération de la montée de concentration du gaz dans l'alvéole [Lamy 1994].

Les concentrations sanguines d'halothane après 10, 20, 40 et 60 minutes d'administration sont respectivement de 63, 81, 71, et 68 $\mu\text{g/ml}$.

II.2.2. Distribution

L'équilibre est rapide dans les viscères : concentrations cérébrale et alvéolaire sont pratiquement égales au bout de quelques minutes [Lamy 1994].

L'halothane est très soluble dans les graisses. Une fraction de la dose administrée est stockée dans le compartiment graisseux de l'organisme. Cette fraction est d'autant plus grande que le compartiment graisseux est important [Goldfarb 1982].

II.2.3. Métabolisme

Dix à 25% de la dose totale administrée sont métabolisés. Le métabolisme a lieu principalement dans le foie et est maximal à la 24ème heure. Il décroît ensuite et persiste durant quelques jours. Il a également lieu pour une faible part dans le rein et le poumon. Le métabolisme de l'halothane est sous la dépendance d'une enzyme microsomale : le cytochrome P 450. Cette enzyme est saturée par des quantités relativement faibles d'halothane dont l'élimination suit alors une cinétique d'ordre zéro : la quantité totale d'halothane dégradée par unité de temps reste constante. Cette quantité peut toutefois être augmentée après administration d'inducteurs enzymatiques tels que le phénobarbital ou même l'halothane qui pourrait accélérer sa propre dégradation [Goldfarb 1982, Lamy 1994].

L'halothane est métabolisé suivant deux voies : 1) une voie oxydative prédominante conduisant à la libération de brome, de chlore et de métabolites à élimination urinaire (l'acide trifluoroacétique et le trifluoroacétyléthanolamide), 2) une voie réductrice conduisant à la libération de fluor et de métabolites volatils (le trifluorochloroéthane, le difluorochloroéthylène et le bromodifluoroéthylène) [Goldfarb 1982, Lamy 1994]. Comme les besoins énergétiques pour rompre la liaison C-F sont deux fois plus importants que ceux nécessaires pour rompre la liaison C-Br ou C-Cl, une faible quantité de fluor est produite [Marshall 1990].

La fraction d'halothane métabolisée suivant la voie réductrice peut varier chez l'animal en fonction de caractères génétiques. La quantité de métabolites réduits est augmentée par l'obésité, l'hypoxie et l'induction enzymatique. Les métabolites intermédiaires issus de cette voie sont très réactifs. Ils ont la capacité de se lier de façon covalente aux protéines et lipides de structure. Leur cinétique métabolique révèle qu'ils sont produits de façon croissante pendant l'administration puis se stabilisent en plateau au bout d'une heure [Goldfarb 1982, Lamy 1994].

II.2.4. Élimination

Après arrêt de l'administration, l'halothane est relargué lentement dans le sang, parfois pendant plusieurs jours [Goldfarb 1982]. D'une façon générale, plus l'anesthésie est prolongée, plus il faut arrêter précocement l'administration des halogénés avant la fin de l'intervention [Lamy 1994].

Environ 60 à 80% de la dose d'halothane absorbée est éliminé de façon inchangée dans l'air expiré dans les 24 premières heures après l'administration et une plus faible quantité continue à être exhalée pendant quelques jours ou semaines. Sur la fraction non exhalée, plus de 50% est biotransformé et le reste est éliminé de façon inchangée par d'autres voies. L'urine contient des composés organiques fluorés, surtout de l'acide trifluoroacétique, qui sont éliminés pendant une semaine après l'opération [Marshall 1990].

II.3. Pharmacodynamie de l'halothane

II.3.1. Effets sur le système nerveux central

L'halothane déprime l'activité neuronale de façon dose-dépendante au niveau du système nerveux central et périphérique et provoque une perte de conscience pour des concentrations alvéolaires très faibles. L'effet anesthésique est défini par la MAC. Celle-ci est diminuée par l'hypoxémie, l'hypotension artérielle, l'anémie, l'hypothermie, la grossesse, la prémédication, l'administration simultanée d'opiacés ou d'autres anesthésiques. Elle est augmentée par l'hyperthermie, l'alcoolisme chronique [Lamy 1994]. La fonction corticale est déprimée pour une concentration plus basse que ne le sont les fonctions médullo-spinales [Firestone 1988].

A l'état de veille, le débit sanguin cérébral (DSC) est autorégulé et couplé aux besoins métaboliques. L'halothane abolit ce couplage métabolique en augmentant le DSC alors que la consommation cérébrale d'oxygène diminue [Lamy 1994]. Le DSC devient directement proportionnel à la pression de perfusion entraînant une augmentation du volume cérébral. Les effets sur l'autorégulation sont augmentés par l'hypercapnie et diminués par l'hypocapnie. L'augmentation du DSC provoque une augmentation de la pression intracrânienne [Lamy 1994].

II.3.2. Effets sur le système cardiovasculaire

L'administration d'halothane est caractérisée par une dépression circulatoire avec une forte réduction de la pression artérielle dose-dépendante. L'hypotension résulte d'un effet prédominant sur le myocarde : le débit cardiaque est diminué proportionnellement à la dose ; une tachycardie induite par le barorécepteur en réponse à l'hypotension est obtenue [Marshall 1990, Lamy 1994]. Quand l'anesthésie est induite par inspiration d'halothane à des concentrations nécessaires pour une anesthésie chirurgicale (0.8 à 1.2%), le débit cardiaque est réduit de 20 à 50% par rapport à celui existant à l'état d'éveil [Marshall 1990].

La contractilité du muscle cardiaque *in vitro* est déprimée par l'halothane de façon dose-dépendante. L'effet inotrope négatif semble être dû à une réduction intracellulaire du calcium attribuée aux actions de l'halothane sur le sarcolemme qui réduisent le flux de calcium à travers les canaux calciques lents [Marshall 1990, Firestone 1988, Lamy 1994].

Le rythme cardiaque est ralenti pendant l'anesthésie. Ceci est dû à la réduction de l'activité sympathique cardiaque. Un rythme nodal apparaît assez souvent ; une modification de la profondeur de l'anesthésie peut amener le retour au rythme sinusal. Des tachyarythmies peuvent aussi se produire en présence d'halothane. Certaines sont de type réentrant car l'halothane diminue la conduction des impulsions et augmente certainement les périodes réfractaires du tissu conducteur. L'halothane sensibilise le myocarde aux effets arythmogènes des catécholamines [Marshall 1990, Firestone 1988, Lamy 1994].

L'halothane influence le flux sanguin de tous les organes par son action sur la production ou le mode d'action des facteurs dérivés de l'endothélium qui régulent le tonus des muscles lisses des vaisseaux. L'halothane exerce un effet vasodilatateur généralisé qui porte à la fois sur la résistance et la capacitance vasculaires [Marshall 1990, Firestone 1988].

II.3.3. Effets sur le système respiratoire

L'halothane entraîne une dépression respiratoire dose-dépendante qui est augmentée par l'administration concomitante de morphiniques et/ou de benzodiazépines. Cette dépression respiratoire est due à une action directe sur les centres respiratoires médullaires ainsi qu'à une action sur les muscles respiratoires thoraciques et le diaphragme. Aux stades chirurgicaux de l'anesthésie, la fréquence respiratoire augmente et le volume courant diminue. La ventilation est rapide et superficielle [Firestone 1988].

L'halothane induit une réduction dose-dépendante de la réponse ventilatoire au dioxyde de carbone. Pour une même concentration de CO₂ exogène inhalée, le sujet sous halothane augmente moins sa ventilation qu'à l'état de veille [Marshall 1990, Lamy 1994]. De même, l'halothane déprime notablement la réponse ventilatoire à l'hypoxémie par action dépressive directe sur les chémorécepteurs périphériques [Lamy 1994].

L'halothane est dit bronchodilatateur ; en fait, il n'augmente pas le calibre des bronches normales mais diminue le bronchospasme induit par une réaction anaphylactique, vagale ou médicamenteuse [Lamy 1994].

II.3.4. Autres effets

L'halothane entraîne une réduction (50 à 60%) dose-dépendante du flux sanguin rénal et du taux de filtration glomérulaire. Les effets rénaux de l'halothane sont rapidement compensés et il n'apparaît pas de trace post-opératoire de trouble rénal [Marshall 1990, Firestone 1988].

Le flux sanguin splanchnique et hépatique est diminué par l'halothane comme une conséquence passive de la réduction de pression de perfusion, mais il n'y a pas de trace d'ischémie manifeste. Les fonctions hépatiques sont déprimées et l'halothane réduit la capacité du système enzymatique microsomal à métaboliser les drogues [Marshall 1990].

II.4. Effets indésirables

II.4.1. Hépatiques

L'incidence des dommages hépatiques est évaluée de 1 pour 3500 à 1 pour 35000 anesthésies [Schwander 1989].

Deux types d'atteintes hépatiques sont décrits. Le premier, observé chez environ 20% des patients se traduit par une augmentation transitoire et modérée des transaminases au cours des deux premières semaines postopératoires et serait favorisé par l'obésité. Le second est une hépatite aiguë exceptionnelle mais sévère. Les expositions multiples sont ici toujours incriminées et apparaissent comme le principal facteur favorisant. Les éléments biologiques marquants sont la détection d'anticorps antinoyaux, antimuscle lisse, antithyroïde, antimicrosomes rénaux. Le pronostic de l'hépatite aiguë est sévère, la mortalité pouvant atteindre 50%. La transplantation demeure parfois le seul recours [Lamy 1994].

Le mécanisme de l'hépatite à l'halothane semble être double : une hépatotoxicité vraie liée directement à l'halothane ou à ses métabolites et une idiosyncrasie susceptible de s'ajouter au mécanisme précédent chez certains patients. Les obèses qui produisent une plus grande quantité de métabolites réduits que les patients de poids normal ont plus fréquemment des perturbations des tests biologiques hépatiques après administration d'halothane que les patients de poids normal. Le ou les métabolites toxiques sont susceptibles de se lier irréversiblement aux microsomes hépatiques ou aux phospholipides membranaires. Cette liaison à des structures cellulaires peut provoquer une nécrose hépatocytaire, surtout dans la région centrolobulaire. La liaison du métabolite toxique aux microsomes contenus dans le réticulum endoplasmique entraînerait la libération du calcium contenu dans le réticulum vers le cytoplasme, bloquant la respiration cellulaire [Goldfarb 1982].

Par ailleurs, il existe de nombreux arguments en faveur d'un mécanisme immunoallergique pour expliquer la survenue des formes ictériques d'hépatite à l'halothane : 1) la fréquence des cas observés après réadministration d'halothane, 2) la fréquence des signes d'hypersensibilité : fièvre, rash cutané, éosinophilie sanguine, 3) la fréquence des auto-anticorps. L'existence d'un tel mécanisme ne contredit pas la possibilité d'un mécanisme toxique concomitant : l'halothane ou ses métabolites provoqueraient des modifications de la membrane de l'hépatocyte. La membrane cellulaire ainsi modifiée pourrait devenir antigénique et provoquer la formation d'anticorps. Ces autoanticorps provoqueraient à leur tour une nécrose hépatique importante [Goldfarb 1982].

II.4.2. Autres effets indésirables

L'autre effet indésirable majeur de l'halothane est son pouvoir d'induction de crise d'HM sur lequel nous reviendrons dans le paragraphe II.7.

L'halothane induit une baisse de la pression sanguine, du rythme et du débit cardiaque et des arythmies ventriculaires ou supraventriculaires (rythme nodal, extrasystoles ventriculaires et tachycardie ventriculaire) peuvent survenir. En cas de surdosage, une hypotension sévère et un accident circulatoire peuvent se produire [Lamy 1994].

Des nausées et vomissements postopératoires peuvent se produire [Martindale 1989].

Des cristaux urinaires d'acide oxalique ont été retrouvés chez certains patients soumis à l'halothane [Martindale 1989].

L'halothane a un faible effet irritant sur les voies aériennes et, si l'anesthésie est légère, il peut favoriser un laryngospasme ou un bronchospasme, en particulier chez les gros fumeurs et les asthmatiques [Firestone 1988]. Une toux et une apnée réflexe peuvent aussi se produire [Schwander 1989].

Il existe aussi une dépression de la contractilité du muscle utérin, une diminution de la fréquence des contractions pendant l'accouchement et une atonie utérine à la période du travail et de la délivrance [Schwander 1989].

Une allergie à l'halothane sous forme d'éruption acnéiforme a été rapportée [Martindale 1989].

Plusieurs études ont suggéré que l'exposition professionnelle à un environnement contenant de l'halothane pendant une période prolongée pourrait entraîner une augmentation de l'incidence des fausses couches. Des mesures efficaces pour réduire la contamination de l'environnement ont été instituées dans tous les lieux où l'anesthésiologie est pratiquée [Marshall 1990].

Des études ont mis à jour des évidences épidémiologiques expérimentales animales d'effets mutagènes, tératogènes et carcinogènes par production de radicaux actifs au cours de la dégradation métabolique de l'halothane [Schwander 1989].

II.5. Précautions d'emploi

II.5.1. Contre-indications

De toute évidence, il est absolument contre indiqué d'administrer de l'halothane aux patients sensibles à l'hyperthermie maligne (cf II.7) ainsi qu'à ceux ayant eu une hypersensibilité antérieure à l'halothane ou aux autres anesthésiques halogénés.

Il est déconseillé d'administrer de l'halothane à des obèses, lorsqu'il existe des antécédents familiaux d'hépatite à l'halothane et à un patient qui a eu un ictère après une précédente administration d'halothane [Goldfarb 1982].

L'halothane réduisant le tonus musculaire de l'utérus gravide, son utilisation n'est pas recommandée en obstétrique à cause du risque accru d'hémorragies postpartum par atonie utérine [Martindale 1989].

II.5.2. Précautions d'emploi

Certaines précautions devraient permettre de réduire les accidents dus à l'administration d'halothane : éviter d'administrer l'halothane à des intervalles inférieurs à un à trois mois. Il n'existe actuellement aucune preuve que, chez l'homme, l'induction enzymatique et/ou l'hypoxémie, augmentent le risque de survenue d'une hépatite à l'halothane, même s'il s'agit là d'une hypothèse plausible [Goldfarb 1982].

Des précautions doivent être prises en cas d'administration d'halothane en anesthésie obstétricale (augmentation des pertes sanguines), chez des patients ayant un dysfonctionnement coronarien ou des antécédents d'arythmie, chez les patients ayant une pression intracrânienne élevée ou des lésions intracrâniennes, chez les patients myasthéniques et en cas de phéochromocytome.

Il est préférable de tenir compte des facteurs diminuant ou augmentant la MAC et d'éviter toute hypoxie et/ou hypercapnie [Schwander 1989].

II.5.3. Interactions médicamenteuses

Les différentes interactions médicamenteuses sont représentées dans le tableau suivant [Firestone 1988, Martindale 1989] :

Substance	Effets, mécanismes et/ou conséquences
<p>β-bloquant, vérapamil catécholamines endogènes et exogènes</p>	<p>dépression cardiaque significative sensibilisation du myocarde d'où extrasystoles supraventriculaires, fibrillation ventriculaire</p>
<p>β-mimétiques, aminophylline</p>	<p>troubles du rythme ventriculaire graves</p>
<p>IMAO non sélectif</p>	<p>collapsus peropératoire</p>
<p>amphétamines, éphédrine et dérivés</p>	<p>poussée hypertensive peropératoire</p>
<p>bicarbonate de sodium</p>	<p>hypotension sévère</p>
<p>hypnotiques, sédatifs, antihistaminiques, prednisolone, phénytoïne</p>	<p>induction enzymatique hépatique</p>
<p>isoniazide</p>	<p>potentialisation de l'effet hépatotoxique de l'isoniazide par formation accrue de ses métabolites</p>
<p>curarisants, relaxants musculaires</p>	<p>effets myorelaxants augmentés</p>
<p>opiacés, barbituriques, sédatifs</p>	<p>dépression respiratoire plus prononcée</p>
<p>ocytocique</p>	<p>inhibition de l'action des ocytociques</p>

II.6. Usage thérapeutique

L'anesthésie générale pour la chirurgie nécessite sommeil, analgésie, suppression des réflexes viscéraux et d'une manière variable relaxation musculaire. Seul le sommeil est complètement obtenu avec l'halothane. L'induction de l'anesthésie (1.5 à 3.5 minutes) et le retour à l'état d'éveil (4 à 16 minutes) sont rapides. L'induction est aisée parce que le larynx n'est pas irrité et un bronchospasme est rare. Cela en fait un produit de choix pour l'induction chez le petit enfant. En revanche, chez l'adulte et le grand enfant, l'induction est généralement faite par des agents hypnotiques en IV. Il est compatible avec la chaux sodée et peut être utilisé avec l'oxygène pour produire une oxygénation maximale ou combiné avec d'autres mélanges gazeux comme le protoxyde d'azote et l'oxygène. La faculté qu'a l'halothane pour induire une hypotension est quelquefois délibérément utilisée pour réduire les pertes de sang sous certaines conditions. La relaxation utérine peut être utile pendant l'extraction du fœtus en cas de naissance par le siège avec rétention de la tête. L'halothane a connu une grande popularité pendant plus de 25 ans et a été utilisé pour toutes sortes de chirurgies. Son administration est associée à un excellent taux de sûreté [Marshall 1990]. Pourtant l'introduction sur le marché de l'enflurane, de l'isoflurane, du desflurane et tout dernièrement du sévoflurane a grandement réduit l'utilisation de l'halothane ces dernières années.

II.6.1. Mode d'administration

Initialement sous forme liquide, l'halothane est administré sous forme de vapeur par l'intermédiaire d'une cuve évaporatrice branchée sur le circuit d'assistance respiratoire du patient.

L'halothane peut être administré dans le circuit de plusieurs manières :

- à l'aide d'un évaporateur. Cette méthode permet d'obtenir une concentration anesthésique stable dans le circuit, bien que la précision de certains évaporateurs ne soit pas parfaite aux bas débits. De plus, l'évaporateur ne permet pas toujours d'administrer une quantité suffisante d'anesthésique pendant l'induction.
- à l'aide d'un appareil Copper Kettle. La concentration anesthésique est stable et plus élevée qu'avec un évaporateur. Cependant, il peut être difficile de maintenir un débit total d'oxygène constant [Firestone 1988].

Un parasympholytique est recommandé à la prémédication. Pour l'induction au masque, on utilise un mélange protoxyde d'azote-oxygène dans lequel on introduit progressivement de l'halothane à des concentrations croissantes de 0.25 à 3% ou davantage [Schwander 1989].

II.6.2. Posologie

En théorie, la dose anesthésique délivrée dans le circuit diminue en fonction du temps de façon prévisible, si bien qu'il est possible d'établir un schéma posologique. La dose cumulative d'anesthésique est directement proportionnelle à la racine carrée du temps, si bien que la même dose, ou dose unitaire sera administrée pour chaque carré d'intervalle de temps après l'induction (soit à 1, 4, 9, 16... min), afin de contrebalancer le stockage tissulaire. Ainsi, une dose unitaire sera captée au bout de 1 minute après l'induction, 2 doses au bout de 4 minutes, 3 doses après 9 minutes et ainsi de suite... Ce calcul ne tient cependant pas compte de la quantité d'anesthésique nécessaire pour remplir le circuit ni de celle contenue dans les tuyaux ou la chaux sodée. En conséquence, chez l'adulte, une dose supplémentaire (dose de priming) est habituellement administrée durant les 9 premières minutes ou avant l'incision chirurgicale en fonction de la tolérance du patient.

En pratique, on dispose le plus souvent d'appareil de mesure de la concentration expirée de l'agent anesthésique, ce qui permet d'ajuster la concentration délivrée quel que soit le débit de gaz frais véhiculant l'agent halogéné. Il est clair que l'utilisation d'agents halogénés en per-opératoire est plus facile et leurs effets plus prévisibles qu'avec les agents hypnotiques administrés par voie IV [Firestone 1988].

La posologie utilisée correspond à 1.3 MAC (soit à peu près la dose efficace chez 95% des patients). En fonction du pourcentage de protoxyde d'azote présent dans le circuit, la MAC des autres anesthésiques utilisés sera diminuée approximativement d'autant [Firestone 1988].

II.7. Halothane et HM

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'HM est liée, entre autres, à une anomalie de la libération de calcium dans les cellules musculaires. Mais cette anomalie ne se révèle qu'au cours d'une anesthésie générale, par l'emploi de curares dépolarisants et d'agents volatils halogénés, dont l'halothane. Quelques arguments permettent de penser que l'halothane agit plus ou moins directement sur le Ca^{2+} cytoplasmique :

- L'inositol 1,4,5-triphosphate-phosphatase (InsP_3 5-ase) est l'enzyme qui métabolise l'inositol 1,4,5-triphosphate (InsP_3) en inositol 1,4-bisphosphate. L'halothane inhibe l' InsP_3 5-ase ce qui entraîne une augmentation de concentration de l' InsP_3 et donc du Ca^{2+} intracellulaire puisque l' InsP_3 est impliqué dans la régulation de la libération du Ca^{2+} des vésicules de la membrane du RS et active les canaux calciques du système T [Foster 1989a].

- L'halothane stimule l'activité ATPasique du RS de lapin et cela paraît être en relation avec l'augmentation de la vitesse de libération du Ca^{2+} dans le RS. L'halothane diminue le délai de libération du Ca^{2+} de façon dose-dépendante [Blanck 1992].

- *In vitro*, au niveau cardiaque, l'halothane diminue en même temps le courant interne de calcium dans des cellules isolées et sur cœur entier, il modifie la densité et la disponibilité des sites de fixation des inhibiteurs calciques des membranes du sarcolemme, indiquant un changement de conformation des canaux calciques voltage-dépendants en présence de l'anesthésique. Ce mécanisme étant certainement en partie responsable de la diminution de la contractilité cardiaque [Lee 1994].

- Au niveau du muscle squelettique de porc, l'halothane bloque à des concentrations cliniques la liaison des inhibiteurs calciques aux membranes cellulaires en diminuant le nombre de récepteurs aux dihydropyridines fonctionnellement actifs. Ceci entraîne une diminution du courant calcique membranaire de surface. La baisse de l'activité des canaux calciques diminue le couplage excitation-contraction et donc réduit la contractilité. Mais ceci est compensé par la stimulation halothane-dépendante de la libération de Ca^{2+} du RS. Autant au niveau cardiaque que musculaire il n'est pour l'instant pas possible de dire si l'halothane a un effet direct sur le récepteur ou/et s'il interagit avec la bicouche lipidique qui à son tour exerce un effet sur le récepteur [Louis 1994].

- La libération de Ca^{2+} en milieu neutre (pH = 7.0) est significativement stimulée à des concentrations cliniques d'halothane alors que ces mêmes concentrations n'ont pas d'effet sur la libération de Ca^{2+} du RS normal à des valeurs de pH inférieures à 6.8 [Louis 1992].

- Au niveau de la recapture du Ca^{2+} , des concentrations cliniques d'halothane stimulent la recapture du Ca^{2+} ATP-dépendant du RS par une action directe sur l'ATPase-calcium, l'enzyme responsable de la recapture, alors que des concentrations 10 à 20 fois supérieures inhibent cette recapture par une perturbation générale des lipides de la membrane du RS [Louis 1992].

Sur le muscle normal, nous avons vu que des concentrations cliniques d'halothane stimulaient la libération de Ca^{2+} du RS mais stimulaient aussi la recapture de ce même Ca^{2+} . Il y a donc un équilibre entre ces deux mouvements antagonistes qui permet de ne pas observer de troubles de la régulation du Ca^{2+} chez les patients HMN. Qu'en est-il chez les sujets HMS?

Tout d'abord au niveau de la libération du calcium, non seulement l'halothane inhibe l'InsP₃5-ase mais en plus cette enzyme a une activité plus faible dans les muscles de porcs HMS (cf I.2.3), ce qui entraîne dans les muscles HMS une augmentation de concentration encore plus importante de l'InsP₃ et du Ca^{2+} [Foster 1989a].

Bien que la libération de Ca^{2+} soit stimulée par des concentrations cliniques d'halothane chez les sujets sains comme chez les sujets HMS, le taux constant pour la libération de Ca^{2+} à partir de RS HMS est toujours significativement plus élevé que pour le RS normal [Louis 1992]. Chez certains patients HMS, l'halothane augmente la probabilité de passage des canaux calciques musculaires (récepteurs à la ryanodine) de la forme fermée inactive à la forme ouverte. Cet effet est associé à une augmentation de la conductance de ces canaux [Nelson 1992].

L'halothane pourrait encore stimuler significativement la libération du Ca^{2+} du RS HMS même à pH 6.4. L'interaction de l'halothane avec les canaux de libération de Ca^{2+} du RS est altérée dans le muscle des porcs HMS puisque le canal peut être activé même à une concentration de Ca^{2+} ou un pH pour lesquels on s'attendrait à ce que le canal reste dans un état fermé. Il y a une interaction directe entre l'halothane et le récepteur à la ryanodine responsable de la libération de Ca^{2+} du RS [Louis 1992].

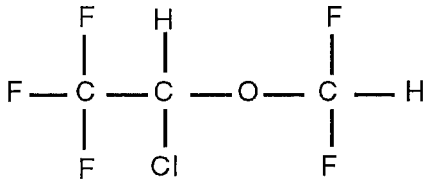
Au niveau de la recapture du calcium, plusieurs études ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre le RS des porcs sains et celui des porcs HMS [Louis 1992].

Chez les sujets HMS, l'halothane induit une augmentation de la libération de calcium mais n'induit pas en contre-partie une augmentation de la recapture, ce qui entraîne un déséquilibre de la régulation du Ca^{2+} intracellulaire certainement en partie responsable des crises d'HM.

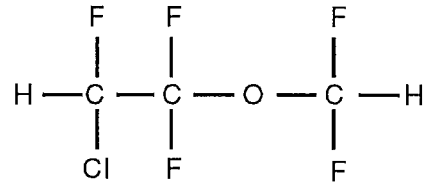
Une des autres hypothèses de la cause de l'HM serait une altération de la perméabilité membranaire (cf I.2.3). De nombreuses études ont mis en évidence l'action de l'halothane sur la structure membranaire. Il modifie la température (T_c) de passage de la phase solide à la phase liquide des modèles membranaires et il peut induire une modification de la fluidité membranaire [Gaillard 1992a]. L'halothane interagit avec les modèles membranaires et induit des changements très importants dans la structure et la dynamique de la bicouche lipidique. A faible concentration d'halothane, la bicouche est perturbée mais sa structure macroscopique reste intacte alors qu'à forte concentration, une nouvelle organisation des lipides sous forme de petites vésicules est stabilisée pour des températures plus élevées que T_c [Gaillard 1992b].

II.8. Autres agents déclenchants

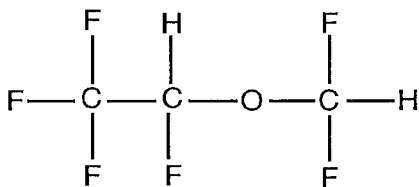
II.8.1. Isoflurane, Enflurane, Desflurane, Sévoflurane



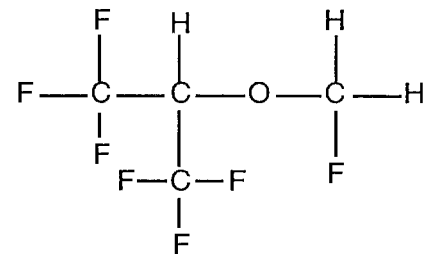
Isoflurane (Ethrane®)



Enflurane (Forane®)



Desflurane (Suprane®)



Sévoflurane (Sévorane®)

Ces quatre agents anesthésiques sont aussi des gaz halogénés dérivés de l'halothane par ajout d'une fonction éther. L'isoflurane et l'enflurane sont des isomères. Le desflurane résulte de la substitution de l'atome de chlore de l'isoflurane par un atome de fluor. L'isoflurane et l'enflurane ont été introduits en clinique au début des années 70 tandis que le desflurane est apparu au début des années 90 et que le sévoflurane est utilisé depuis 1994. Ils exposent tous les 4 au risque d'hyperthermie maligne chez les sujets prédisposés.

L'isoflurane a une vitesse d'induction de l'anesthésie pratiquement 2 fois plus rapide que celle de l'halothane mais sa puissance anesthésique est 2 fois moins importante. Il est moins dépresseur cardiaque.

L'isoflurane n'est métabolisé qu'à 0.2% mais cela ne peut pas complètement exclure un risque hépatotoxique [Firestone 1988]. Il a une stabilité physico-chimique très supérieure à celle de l'halothane et de l'enflurane et une plus faible solubilité dans le sang donc une maniabilité théoriquement plus aisée [Schwander 1989].

Il est aussi capable de provoquer une crise d'HM puisque deux cas de crise d'HM ont été rapportés à la suite d'administration d'isoflurane [Thomas 1987, Chambers 1994] mais une étude chez le porc a montré que le temps d'exposition au bout duquel la crise apparaît est 2.5 fois plus long que pour l'halothane [Wedel 1993].

L'enflurane a les mêmes caractéristiques que l'isoflurane en ce qui concerne la vitesse d'induction et la puissance anesthésique. Il est métabolisé à 2% du fait de sa stabilité chimique et de sa faible liposolubilité [Firestone 1988]. Son métabolisme produit du CO₂ et des métabolites urinaires non volatils. Le taux d'ions fluor inorganiques libérés est faible, d'où une néphrotoxicité quasi nulle [Lamy 1994].

Depuis 1983, quelques hépatites à l'enflurane ont été décrites, toutes graves. Le métabolisme de l'enflurane étant uniquement oxydatif, le mécanisme suspecté est une acétylation des protéines de structure avec formation d'un antigène [Lamy 1994]. A une concentration supérieure à 2% il produit une activité épileptiforme sur l'électroencéphalogramme [Firestone 1988].

Le desflurane a une vitesse d'induction de l'anesthésie 5 fois plus rapide que celle de l'halothane mais sa puissance anesthésique est 12 fois moins importante [Lamy 1994]. Les concentrations alvéolaires peuvent être ajustées plus rapidement et plus précisément qu'avec les autres agents halogénés, et le retour à l'état d'éveil est plus rapide [Eger 1992].

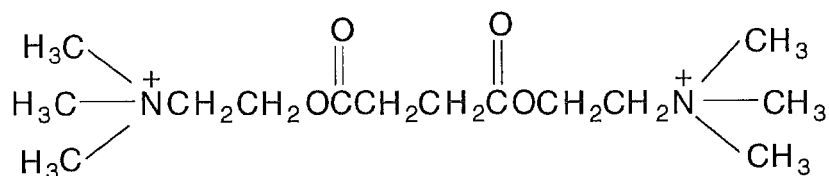
Son métabolisme est négligeable (0.02%) et ses métabolites n'ont pas encore été identifiés. Il est très irritant pour les voies aériennes [Lamy 1994, Eger 1992].

Il est potentiellement capable d'induire une crise d'HM. Sur le porc, une étude a montré que la crise survenait au bout d'un temps d'exposition trois fois plus long qu'avec l'halothane [Wedel 1993].

Le sévoflurane a une vitesse d'induction de l'anesthésie 3 fois plus rapide que celle de l'halothane mais sa puissance anesthésique est 5 fois moins importante. Les délais de réveil sont généralement plus courts après une anesthésie au sévoflurane qu'avec les autres agents anesthésiques volatils. Il est métabolisé à 2.4%. Ses métabolites sont l'hexafluoroisopropanol (HFIP) et des ions fluorures [Lamy 1994]. Une fois formé, l'HFIP est rapidement conjugué avec l'acide glucuronique et excrété dans les urines.

Il induit une peroxydation lipidique *in vivo* et *in vitro* sur les microsomes de foie de porcs, mais il est encore difficile de dire s'il est hépatotoxique ou non [Sato 1994].

II.8.2. Suxaméthonium



Le suxaméthonium est un curare dépolarisant qui agit par interruption de la transmission de l'influx nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire [Taylor 1990].

Il est commercialisé sous forme d'iodure (Célocurine®). Il est utilisé en injections ou perfusions IV et permet d'obtenir en moins de 60 sec un bloc musculaire dépolarisant. Il est utilisé comme adjuvant de l'anesthésie pour permettre entre autres de réaliser l'intubation rapide de la glotte [Fletcher 1986]. Le suxaméthonium peut être administré dans tous les cas où l'on désire une relaxation musculaire : interventions chirurgicales, intubation trachéale, réduction de fractures et de luxations, mobilisation des articulations, traitement à l'électrochoc, mais actuellement il est assez peu utilisé.

Il est faiblement toxique, rapidement décomposé dans l'organisme en métabolites naturels et n'a pas d'effets cumulatifs lors des réinjections. Son action rapide, et en général très brève, provient de son hydrolyse par les pseudocholinestérases plasmatiques dont l'activité dépend d'un facteur génétique. Le suxaméthonium est d'abord hydrolysé en succinylmonocholine et en choline, en 2 à 4 minutes après l'injection, sous l'action d'une enzyme : la pseudocholinestérase plasmatique. La succinylmonocholine est ensuite hydrolysée en choline et en acide succinique. Mais cette hydrolyse est plus lente et dure 6 à 7 fois plus longtemps que la première. Elle est sous la dépendance d'une estérase hépatique.

Associé aux halogénés, il entraîne, chez un sujet sensible, un trismus et une rigidité musculaire précoce. Utilisé isolément il ne semble pas pouvoir déclencher une crise mortelle d'HM [Fletcher 1986].

L'injection de suxaméthonium chez des porcs entraîne des fasciculations et un spasme du masséter autant chez les animaux HMS qu'HMN. Mais l'amplitude et la durée de ces fasciculations sont plus importantes chez les animaux HMS qui, plus tard, développent un épisode fulminant d'HM : le suxaméthonium induit non seulement tachycardie, hyperthermie, contractures musculaires et une élévation de la PaCO₂ et du lactate (indicateurs classiques de la crise) mais aussi une sévère hypotension et un taux élevé de catécholamines. Les porcs sains ne développent ni d'effets cardiovasculaires ni d'altération métabolique après l'administration de suxaméthonium. Le pré-traitement des animaux avec un myorelaxant non dépolarisant minimise les fasciculations mais ne prévient pas l'hypotension ni la crise d'HM [Iaizzo 1994].

Troisième partie :

Dantrolène (Dantrium®)

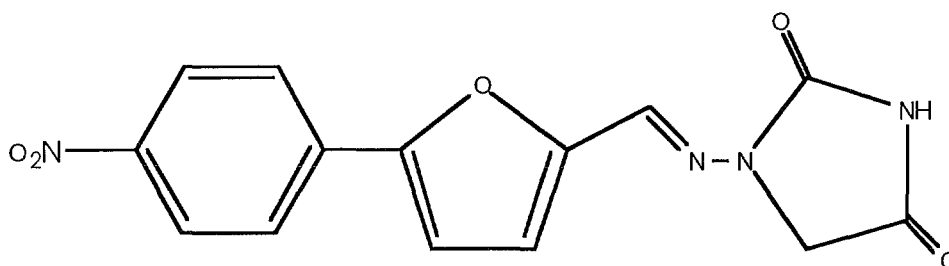
III.1. Introduction

Le dantrolène est une molécule originale appartenant à la famille des hydantoïnes. Il est prescrit depuis longtemps par les neurologues pour les troubles spastiques et a été utilisé pour la première fois en 1975 dans le traitement de la crise d'HM [Britt 1984]. Il représente à l'heure actuelle le seul traitement spécifique de la crise d'HM.

Un autre composé (l'azumolène) de la famille des hydantoïnes dérivé du dantrolène a été étudié. Il était 50 fois plus hydrosoluble et 30 à 50% plus puissant que le dantrolène pour faire baisser la $[Ca^{2+}]_i$ libre dans le muscle HMS et dans le muscle contrôle [Allen 1992]. Mais à l'heure actuelle il n'a pas été commercialisé.

III.1.1. Structure chimique du dantrolène

Formule chimique : $C_{14}H_{10}N_4O_5$ (C 53.51%, H 3.21%, N 17.83%, O 25.45%).



Poids moléculaire : 314.26 g

Noms chimiques : **1-[[[5-(4-Nitrophényl)-2-furanyl]-méthylène]amino]-2,4-imidazolidinedione** ou 1-[[5-(p-nitro-phényl)furfurylidène]amino]hydantoïne [Merck 1989].

III.1.2. Propriétés physicochimiques

Le dantrolène est très lipophile, non chargé, il peut aisément se dissoudre dans la bicouche lipidique [Hayashi 1994].

Son sel de sodium est soluble dans l'eau (0.2 mg/ml) et encore mieux dans les solutions alcalines [Merck 1989].

III.2. Pharmacocinétique du dantrolène

III.2.1. Absorption

L'absorption du dantrolène dans le tractus gastro-intestinal est lente et incomplète (20 à 35%) mais suffisamment importante pour produire des concentrations dose-dépendantes dans le plasma [Bianchine 1990]. L'administration *per os* d'une seule dose de 100 à 125 mg de dantrolène entraîne un pic plasmatique compris entre 0.7 et 1.7 µg/ml 3 à 6 heures après la prise. Le taux plasmatique lors d'une administration chronique est de 2 à 3 µg/ml [Herman 1972].

III.2.2. Distribution

Le dantrolène est lié de façon importante (88%) et facilement réversible aux protéines plasmatiques. Il diffuse dans la plupart des compartiments tissulaires [Martindale 1989]. Il traverse le placenta [Schaad 1989].

III.2.3. Métabolisme

Le dantrolène est lentement métabolisé dans le foie par hydroxylation, N-réduction et acétylation. Il est d'abord métabolisé en 5-hydroxydantrolène (demi-vie 15 h) et ensuite en amino- et acétamido-dantrolène. L'acide nitrophénylfuroïque peut aussi être un métabolite produit par l'hydrolyse et l'oxydation du dantrolène. Le dérivé 5-hydroxydantrolène est pharmacologiquement actif (relaxant musculaire) mais moins puissant [Britt 1984].

III.2.4. Élimination

Environ 20% d'une dose administrée par voie orale est éliminé dans les urines essentiellement sous forme de 5-hydroxydantrolène (79%), mais aussi de dérivés acétylés (17%) et sous forme inchangée (1 à 4%) [Pinder 1977]. Il existe aussi une élimination biliaire [Martindale 1989]. La demi-vie d'élimination du dantrolène chez l'adulte est d'environ 9 heures après une dose de 100 mg par voie orale [Bianchine 1990].

III.3. Pharmacologie du dantrolène

Le dantrolène est un myorelaxant qui agit directement sur la contraction des fibres musculaires striées. Il stabilise le calcium dans le RS, empêchant ainsi l'interaction des filaments d'actine et de myosine nécessaire à la contraction musculaire [Schaad 1989]. Il ne modifie pas la conduction nerveuse (pas d'effet anesthésique local) ni la transmission neuromusculaire (pas d'effet curarisant). Le dantrolène diminue davantage la contraction volontaire que la contraction réflexe. Il ne change pas les propriétés électriques des membranes du muscle squelettique [Bianchine 1990]. A dose thérapeutique efficace, on n'observe pas d'effets sur la musculature lisse ni sur le myocarde.

Le mécanisme d'action probable de l'effet myorelaxant est un découplage excitation-contraction par inhibition des mouvements intracellulaires du calcium [Bianchine 1990]. Le dantrolène réduit rapidement la $[Ca^{2+}]_i$ libre en s'opposant aussi à la libération de Ca^{2+} du RS par réduction de la fréquence de l'ouverture spontanée du complexe canaux calciques/récepteurs à la ryanodine du RS [Allen 1992] et par son action sur la libération de Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} [Ohnishi 1983].

Chez des sujets HMS, une injection de dantrolène induit une réduction dose-dépendante de la $[Ca^{2+}]_i$ plus importante que chez les sujets HMN [Lopez 1992] et il apparaît que sa capacité à prévenir l'induction d'une crise d'HM passe par ce mécanisme [Allen 1992]. Une étude sur RS de porcs HMS a montré que le dantrolène inhibe la libération de Ca^{2+} induite par l'halothane mais n'inhibe pas la libération de Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} [Ohnishi 1986].

De plus, le dantrolène aurait une action sur d'autres cellules comme la cellule cérébrale. En présence de dantrolène, on a pu mettre en évidence une augmentation de l'activité de l'acide glutamique-décarboxylase, enzyme responsable de la formation du GABA, dans différentes régions du cerveau [Schaad 1989]. Le dantrolène a un effet protecteur contre la neurotoxicité induite par le glutamate [Frandsen 1991]. Il a été montré que le dantrolène bloque la libération de calcium dans les synaptosomes cérébraux du rat et dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe sans affecter le recaptage [Kochs 1993].

En présence d'halothane, le dantrolène inhibe la réponse excitation-contraction induite par l'anesthésique ainsi que par la caféine dans le muscle squelettique [Ohnishi 1983]. Du fait de sa liposolubilité, le dantrolène peut s'incorporer dans la bicouche lipidique et pourrait agir directement sur les phospholipides membranaires puisqu'il inhibe l'augmentation de la fluidité membranaire induite par l'halothane [Ohnishi 1986, Gaillard 1992a, Gaillard 1992b].

III.4. Effets indésirables

III.4.1. Effets musculaires

L'effet indésirable le plus commun du dantrolène est l'induction d'une faiblesse musculaire généralisée. Cet effet peut être transitoire, léger ou persistant [Bianchine 1990]. A partir d'une dose de 2 mg/kg administrée en aigu, cette faiblesse musculaire se traduit par une difficulté à la marche pendant plus de 2 h après le moment de son administration [Allen 1992].

III.4.2. Effets hépatiques

Des hépatites mortelles ont été rapportées chez environ 0.1 à 0.3% des patients traités au dantrolène pour spasticité pendant au moins 60 jours. Une hépatite symptomatique peut survenir chez 0.5% des patients traités par le dantrolène pendant plus de 60 jours et des anomalies du fonctionnement hépatique ont été notées chez plus de 1% de ces patients. Du fait de ces risques d'hépatotoxicité, les administrations à long terme de dantrolène doivent être arrêtées si aucun bénéfice net n'est noté au bout de 45 jours de traitement [Bianchine 1990].

III.4.3. Effets cutanés

Le dantrolène est un médicament inducteur d'acné bien que celle-ci soit rare au vu de la fréquence de prescription de ce médicament. L'aspect de l'éruption est monomorphe, constitué au départ et essentiellement de lésions rétentionnelles : comédons et microkystes. Les éléments inflammatoires n'apparaissent que secondairement. L'acné ne survient généralement qu'après une assez longue période de prise du dantrolène (2 à 12 mois). Le lieu d'apparition de l'acné est varié : visage, tronc, zones de frictions. La survenue d'acné n'oblige pas en règle générale à suspendre le traitement et peut être améliorée par la vitamine A acide en applications locales [Bedane 1988].

III.4.4. Effets neurologiques

Euphorie, vertiges, somnolence et fatigue sont fréquents en début de traitement mais ces effets sont généralement transitoires. Néanmoins, les patients doivent faire attention lors de la conduite de véhicules [Bianchine 1990, Martindale 1989]. Des confusions mentales ainsi que des dépressions ont été rapportées [Martindale 1989].

III.4.5. Effets gastro-intestinaux

La diarrhée qui peut survenir chez certains patients peut être évitée par une augmentation plus progressive des doses administrées et ne nécessite pas l'arrêt du traitement [Bianchine 1990, Martindale 1989]. Des nausées, vomissements, constipation, hémorragies gastro-intestinales, crampes abdominales, obstructions intestinales peuvent aussi se produire [Martindale 1989].

III.4.6. Autres effets

Tachycardie, péricardite, phlébite, épanchement pleural, hématurie, présence de cristaux dans les urines, pollakiurie, rétention urinaire, miction impérieuse, coloration des urines, convulsions, maux de tête, troubles visuels peuvent aussi survenir [Martindale 1989].

Le dantrolène à fortes doses est carcinogène chez certains animaux [Martindale 1989].

III.5. Précautions d'emploi

III.5.1. Contre-indications

L'insuffisance hépatocellulaire, respiratoire ou cardiaque grave sont des contre-indications à l'administration de dantrolène. Ces contre-indications sont bien entendu relatives lors de l'administration du dantrolène lors d'une crise suspecte ou franche d'HM où le pronostic vital du patient est en jeu.

III.5.2. Précautions d'emploi

Des tests des fonctions hépatiques doivent être faits chez tous les patients pendant l'administration de dantrolène. En cas d'élévation de ces valeurs le traitement devra être interrompu. Le dantrolène devra être administré avec précaution chez les patients ayant des troubles cardiaques ou pulmonaires [Martindale 1989]. Le risque d'hépatotoxicité est 2 fois plus élevé chez les femmes de plus de 35 ans [Schaad 1989].

En raison du pH très alcalin (9.5) de la solution injectable, il est préférable d'éviter une diffusion accidentelle en dehors de la veine perfusée.

III.5.3. Interactions médicamenteuses

Les effets du dantrolène sur le système nerveux central peuvent être augmentés par les tranquillisants et les autres déprimeurs du système nerveux central comme l'alcool. L'administration concomitante d'œstrogènes peut augmenter le risque de troubles hépatiques. Une réduction importante de la liaison du dantrolène à la sérum albumine se produit en présence de molécules fortement liées aux protéines plasmatiques comme la warfarine et le clofibrate. En revanche, le tolbutamide qui a les mêmes propriétés, augmente la liaison du dantrolène à la sérum albumine. Des interactions importantes ont eu lieu avec le vérapamil ou la nifédipine chez l'animal. Par mesure de prudence on évitera l'association de dantrolène avec les inhibiteurs calciques [Martindale 1989].

III.6. Usage thérapeutique

III.6.1. Indications thérapeutiques

III.6.1.1. Spasticité

Chez les patients avec des lésions des motoneurones supérieurs, la spasticité est généralement diminuée par le dantrolène. Le dantrolène améliore la capacité fonctionnelle pour de nombreux patients paraplégiques et hémiparétiques. Il réduit les clonies, les mouvements réflexes et les résistances anormales à l'étirement passif. Environ la moitié des patients ayant une paralysie cérébrale athéroïde et 30 à 40% de ceux ayant une sclérose en plaques sont suffisamment améliorés pour justifier une poursuite du traitement. A cause de la faiblesse musculaire induite par le dantrolène, son utilisation majeure s'applique à des patients hospitalisés pour lesquels les soins sont rendus difficiles par les contractions musculaires et pour lesquels l'amélioration de la spasticité justifie les risques d'hépatotoxicité [Bianchine 1990].

III.6.1.2. Hyperthermie maligne

Associé aux mesures d'urgence de rétablissement des troubles hydroélectrolytiques et métaboliques, le dantrolène joue un rôle majeur dans le traitement de la crise d'hyperthermie maligne.

III.6.1.3. Syndrome malin des neuroleptiques

Le dantrolène est également efficace en cas de syndrome malin des neuroleptiques, une réaction idiosyncrasique survenant de 24 à 72 heures après l'administration d'un neuroleptique. Les troubles seraient dus au blocage des récepteurs à la dopamine de l'hypothalamus et des noyaux de la base. La thermogénèse est due à la contraction tonique des muscles [Schaad 1989].

III.6.2. Mode d'administration et posologie

III.6.2.1. Spasticité

Utiliser la plus faible dose compatible avec l'efficacité. La posologie utile doit être recherchée individuellement en fonction des résultats cliniques de façon à n'éliminer que les manifestations gênantes de spasticité. Il est souhaitable de commencer à dose faible, 25 mg par jour, et d'augmenter progressivement par fractions de 25 mg sans dépasser 400 mg par jour pour un adulte. Chaque nouvelle posologie doit être maintenue plusieurs jours afin d'évaluer les résultats cliniques avant d'augmenter à nouveau la dose. Administrer les gélules au cours des repas en 2 ou 3 prises par jour. Chez l'enfant, commencer le traitement à raison de 1 mg/kg par jour en 2 prises au cours des repas. Augmenter par fractions de 0.5 mg/kg/jour. La dose thérapeutique usuelle est voisine de 3 mg/kg/jour. Ne pas dépasser 6 mg/kg/jour (ou 200 mg/jour au total).

III.6.2.2. Hyperthermie maligne

Le dantrolène est administré à la dose initiale de 2.5 mg/kg en intraveineux lent (2 minutes environ) dès que la crise d'HM est identifiée. En l'absence de régression des signes (relaxation musculaire, réduction de la tachycardie et des troubles du rythme cardiaque), des réinjections peuvent être effectuées à la dose de 1 mg/kg ; la dose totale peut atteindre 10 mg/kg en 15 minutes. Le traitement est poursuivi à raison de 1 à 2 mg/kg toutes les 4 à 6 heures pendant 72 heures (intraveineux puis per os), en unité de soins intensifs, afin de prévenir les récurrences. Une des raisons de l'échec du traitement peut-être le retard pris pour le diagnostic. En effet, au stade des contractures musculaires intenses, le produit administré ne peut être véhiculé par le débit sanguin et agir au niveau de la cellule musculaire.

Le dantrolène peut être donné en prophylaxie (avant l'intervention chirurgicale) aux patients qui peuvent être jugés susceptibles à l'HM [Bianchine 1990]. La posologie est de 4 à 8 mg par jour, en fractionnant la dose en 3 ou 4 prises, pendant 1 à 2 jours, la dernière dose étant administrée 3 à 4 heures avant l'anesthésie. Plus récemment on a proposé de limiter la prophylaxie à une seule dose intraveineuse (2.5 mg/kg), administrée avant l'intervention [Schaad 1989]. Mais ce traitement prophylactique est controversé.

III.6.2.3. Syndrome malin des neuroleptiques

La posologie préconisée pour le traitement de la crise d'HM est efficace pour le traitement de ce syndrome [Schaad 1989].

III.6.3. Présentations et dosages

Une ampoule de dantrolène contient 20 mg de produit lyophilisé (poudre orange) et 3 g de mannitol, qui facilite sa dissolution, dans 60 ml d'eau pour préparation injectable [Allen 1992]. Cependant, la dissolution de la poudre reste difficile et demande du temps. Il y a lieu de tenir compte de la durée limitée de stabilité des solutions (6 heures), donc de les préparer juste avant emploi et de s'assurer de leur limpidité. Il est nécessaire de conserver les flacons à température ambiante (entre 15 et 30 °C) et à l'abri de la lumière directe.

Pour la voie orale, il existe des capsules contenant 25 ou 100 mg de dantrolène [Bianchine 1990].

Quatrième partie :

Expérimentation

IV.1. Introduction

Comme nous l'avons dit précédemment (cf I.3.3), la Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire du phosphore 31 (SRM ^{31}P) *in vivo* pourrait être utilisée dans le cadre du dépistage non invasif du caractère HM de par les anomalies qu'elle met en évidence chez les sujets HMS (élévation plus importante du rapport (Pi/PCr), resynthèse de la PCr plus lente en récupération).

Il a été également décrit une autre anomalie métabolique chez les patients HMS : une élévation du rapport PDE/PCr dans le muscle de la jambe [Payen 1991]. Ce nouveau paramètre associé au rapport Pi/PCr a permis d'élaborer un score d'anomalies SRM chez les sujets HMS, avec une sensibilité de 96% et une spécificité de 93% [Payen 1993]. L'étude prospective de ce score est en cours.

La signification de ce taux élevé PDE/PCr chez les patients HMS reste mal expliquée. Un taux élevé de PDE/PCr a aussi été rapporté dans d'autres myopathies lors d'études *in vivo* [Newman 1982, Barany 1989]. Dans le muscle, la glycérophosphorylcholine (GPC) est le PDE le plus abondant. Des études réalisées par SRM ^{31}P *in vitro* sur les PDE provenant d'extraits perchloriques de muscle normal ont mis en évidence la présence de GPC [Chalovich 1979, Burt 1976] qui est un produit hydrosoluble du catabolisme des phospholipides [Van den Bosch 1974]. Une quantité de GPC élevée a été retrouvée dans le muscle pectoral du poulet dystrophique [Chalovich 1979]. Le muscle de type I est plus riche en GPC que le muscle de type II et la transformation induite par stimulation électrique d'un muscle de type II en type I s'accompagne d'une augmentation de GPC [Burt 1982].

Le but de ce travail *in vitro* a été de répondre à plusieurs objectifs :

- * Identifier l'espèce biochimique vue dans la région des PDE au cours des examens *in vivo*
- * Comparer les résultats des extraits musculaires entre les 2 groupes
- * Préciser l'origine de cette anomalie dans la susceptibilité à l'HM

IV.2. Matériel et méthodes

IV.2.1. Matériel

Ce travail a été réalisé à partir de fragments musculaires prélevés par biopsie chirurgicale chez des patients soumis au dépistage de la susceptibilité à l'HM. Les biopsies ont été effectuées entre Octobre 1990 et Mars 1994 dans le département d'Anesthésie-Réanimation du CHU Albert Michallon de Grenoble (Dr Jacquot, Pr Stieglitz), et quelques spécimens musculaires ont été également fournis par l'unité d'HM du St James Hospital de Leeds en Grande-Bretagne (Pr Ellis).

Le mode de prélèvement musculaire est effectué de la même façon dans les deux centres, sous anesthésie loco-régionale au niveau du muscle vaste interne droit ou gauche. Plusieurs fragments sont prélevés : 6 à 8 pour le test de contracture *in vitro* du laboratoire d'HM du centre de prélèvement, 2 pour les études histologiques et un de 2 à 2.5 cm de long et d'un poids voisin de 400 mg pour notre étude. Ce dernier fragment est immédiatement plongé dans l'azote liquide (-196°C) où il sera conservé jusqu'à son extraction.

IV.2.2. Méthodes

L'ensemble des biopsies (n = 44) a été traité selon deux méthodologies différentes :

- extrait en milieu acide puis SRM ^{31}P *in vitro* (n = 37),
- extrait en milieu organique et chromatographie sur couche mince (n = 9).

Les biopsies de 2 sujets ont été conjointement traitées par les deux méthodes.

IV.2.2.1. Analyse par SRM des extraits perchloriques

IV.2.2.1.1. Extraits perchloriques

L'acide perchlorique (PCA ou HClO_4) entraîne la lyse des membranes cellulaires, la précipitation des macromolécules (protéines, acides nucléiques...) et la libération dans la solution des métabolites solubles, c'est à dire ceux qui sont vus par la SRM *in vivo*. L'extraction se fait en trois étapes et toujours dans la glace pilée pour maintenir la température la plus proche possible de 4°C.

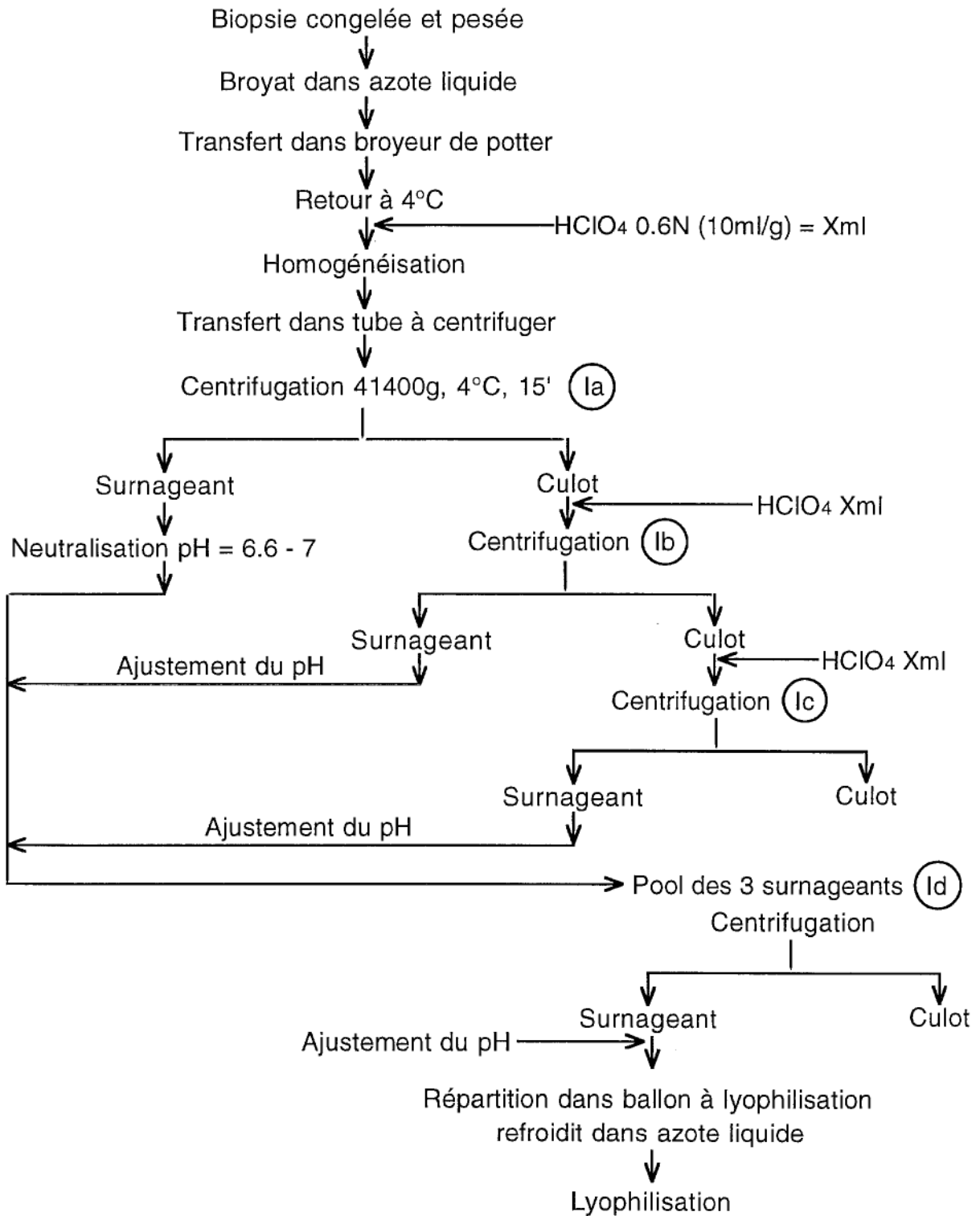


Figure IV.1. Première étape de l'extraction perchlorique

IV.2.2.1.1.1. Étape 1 : première lyophilisation

Le déroulement de cette étape est représenté sur la figure IV.1.

La biopsie est retirée de l'azote liquide dans lequel elle était conservée depuis le prélèvement chirurgical. Elle est pesée (le poids du tissu congelé est très voisin de celui du tissu frais) puis broyée dans l'azote liquide à l'aide d'un pilon et d'un mortier, préalablement refroidis dans l'azote liquide, jusqu'à obtention d'une fine poudre. Le tissu est en permanence immergé dans l'azote liquide pour faciliter et obtenir le meilleur rendement de broyage. De plus, cette précaution assure constamment au tissu un environnement à basse température.

Une fois l'azote liquide évaporé, la poudre est introduite dans un broyeur de potter également refroidi dans l'azote liquide. Après retour de la poudre à 4°C l'acide perchlorique 0.6 N froid est introduit dans le potter à raison de 10 ml pour 1 g de tissu congelé. L'ensemble est homogénéisé (homogénéisateur RZR 50, 2000 rpm, 10 à 20 A/R du piston) puis introduit dans un tube à centrifuger de 50 ml en Nalgène.

Une centrifugation (Beckman J2-21, rotor JA20) est effectuée à 41400 g, 4°C pendant 15 min. Le surnageant est rapidement neutralisé par de la potasse (KOH) 10 N (0.14 ml de KOH 10 N pour 1 ml de surnageant) puis ajusté avec des solutions de KOH et HClO₄ plus diluées pour amener le pH entre 6.6 et 7. Le surnageant est laissé au repos à basse température pour bien précipiter les sels de chlorate. Le culot de centrifugation est repris par le volume de PCA défini précédemment puis centrifugé. Cette procédure est répétée deux fois.

Après chaque centrifugation, le surnageant est neutralisé puis les trois surnageants sont réunis (le pH est maintenu entre 6.6 et 7) et centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment pour séparer les sels de chlorate du surnageant.

Le surnageant final est recueilli, son pH est vérifié, puis il est réparti dans un ballon à lyophilisation de 100 ml préalablement refroidi dans l'azote liquide afin de faire passer le surnageant de l'état liquide à l'état solide dans les plus brefs délais. La répartition dans le ballon doit se faire sur le maximum de surface afin d'obtenir une lyophilisation homogène et efficace.

Une fois le surnageant solidifié, le ballon est mis sur un lyophilisateur (Christ Alpha I-5) pendant 6 à 7 heures. La pression ne doit pas dépasser 0.1 mbar. Le lyophilisat recueilli est appelé lyophilisat I.

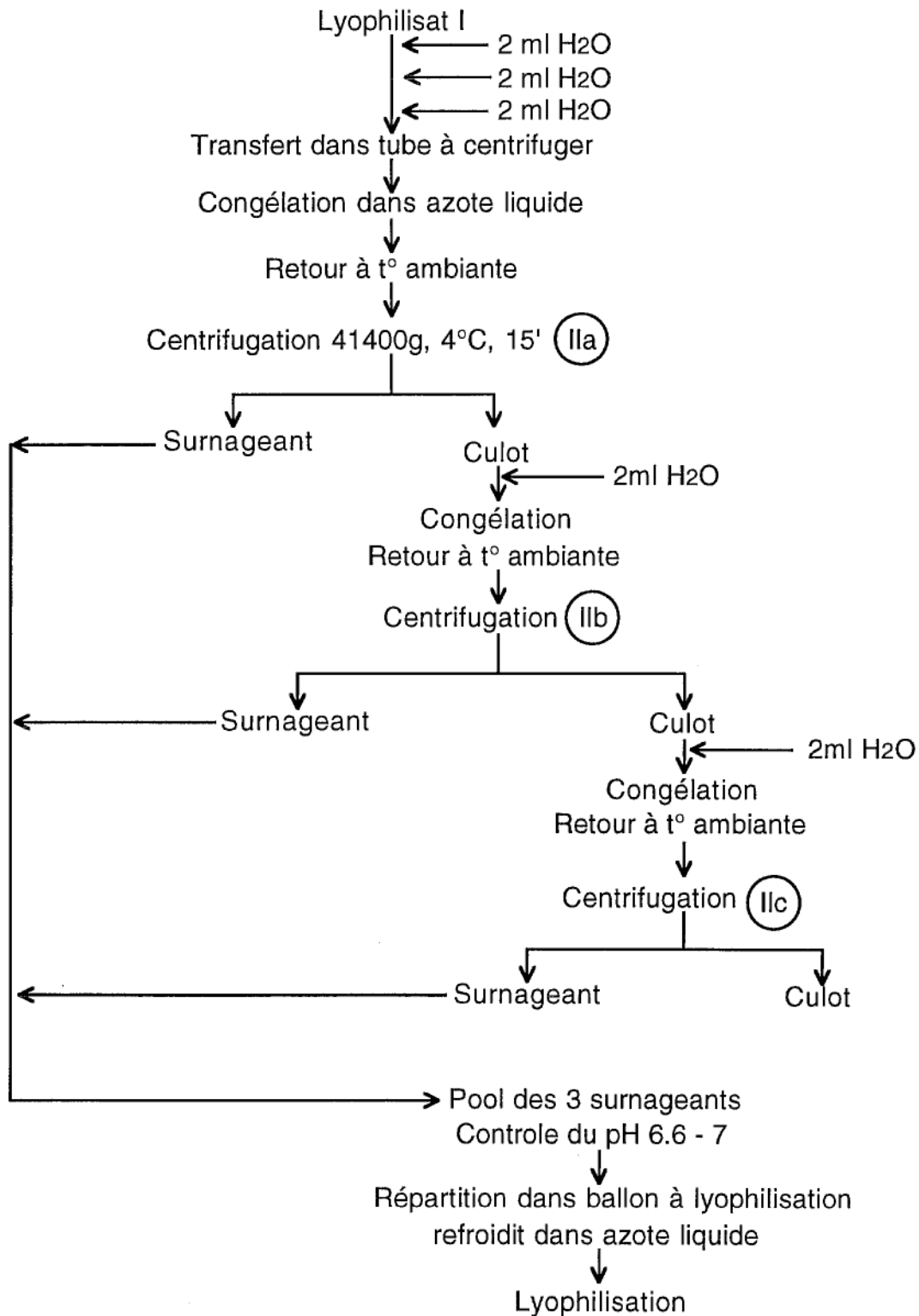


Figure IV.2. Deuxième étape de l'extraction perchlorique

IV.2.2.1.1.2. Étape 2 : deuxième lyophilisation

Cette étape (Figure IV.2) a pour but d'éliminer les éventuelles impuretés pouvant précipiter et rompre l'homogénéité de l'échantillon. Le lyophilisat I est repris par trois fois 2 ml d'eau distillée. La solution est transférée dans un tube à centrifuger, congelée dans l'azote liquide puis décongelée. La solution est ensuite mise à centrifuger dans les mêmes conditions que dans l'étape 1.

Le culot de centrifugation est repris deux fois par 2 ml d'eau distillée et centrifugé. Les trois surnageants sont rassemblés, le pH doit toujours être maintenu entre 6.6 et 7. La répartition du pool de ces trois surnageants dans un ballon à lyophilisation de 50 ml refroidi à l'azote liquide est effectuée comme dans l'étape 1.

La lyophilisation est semblable à celle de l'étape 1. Le lyophilisat recueilli au bout de 6 à 7 heures est appelé lyophilisat II.

IV.2.2.1.1.3. Étape 3 : suspension dans l'eau lourde

C'est la dernière étape (Figure IV.3) avant l'analyse de l'échantillon par SRM. Le lyophilisat II est repris successivement par 1 ml puis 0.5 ml d'eau lourde (D_2O). L'eau lourde est indispensable à l'analyse des échantillons en SRM haute résolution pour verrouiller le champ magnétique. Le lyophilisat II est remis en solution, transféré dans un tube Eppendorf de 1.5 ml puis plongé dans l'azote liquide pour précipiter les impuretés. La décongélation se fait à température ambiante. Le tube est mis à centrifuger (Jouan MR 14.11) à 12500 g, 4°C pendant 10 min.

Le surnageant est récupéré puis mis dans un cryotube. Le contenu est congelé dans l'azote liquide. Le cryotube est obturé par un Parafilm perforé afin d'éviter toute fuite du lyophilisat puis il est mis dans un ballon en verre de 50 ml. Le ballon est placé sur le lyophilisateur pendant 6 à 7 heures. A la fin de la lyophilisation, le cryotube contenant le lyophilisat III est obturé puis immergé dans l'azote liquide et conservé ainsi jusqu'à l'analyse SRM de l'échantillon.

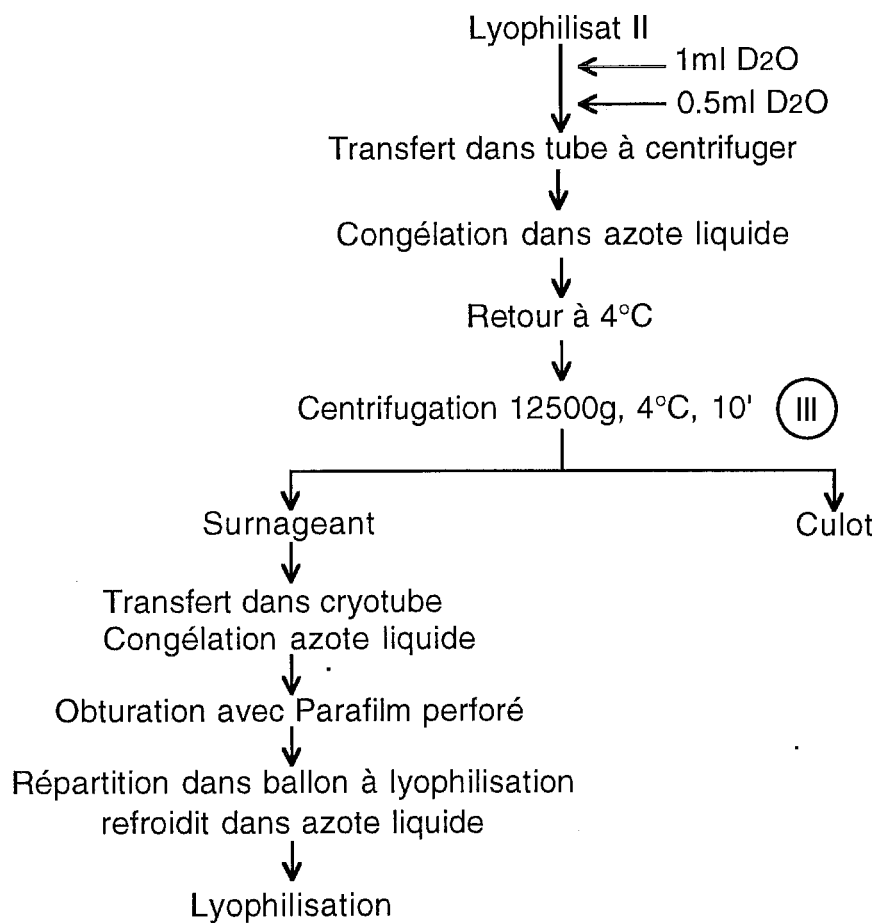


Figure IV.3. Troisième étape de l'extraction perchlorique

IV.2.2.1.2. SRM du Phosphore 31

IV.2.2.1.2.1. Préparation de l'échantillon

L'échantillon lyophilisé jusqu'alors conservé dans l'azote liquide est repris par 350 μ l de D₂O puis centrifugé pendant 10 min à 12500 g (Jouan MR 14.11). Le surnageant est prélevé, son pD est mesuré et doit être amené à 8 ($\text{pH} = \text{pD} + 0.4$) à l'aide de solutions de NaOD et DCl de différentes normalités. Ensuite il est introduit dans un tube pour analyse par SRM de 5 mm de diamètre.

IV.2.2.1.2.2. Acquisition SRM

L'acquisition RMN est faite dans un spectromètre haute résolution AM 400 du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA, Grenoble) muni d'une sonde pour des tubes de 5 mm. L'homogénéité du champ magnétique est affinée jusqu'à ce que la largeur à mi-hauteur du pic de l'eau en SRM ¹H soit inférieure à 2 Hz. La fréquence de résonance du noyau de Phosphore 31 est de 161.98 MHz. La fenêtre spectrale est de 6410 Hz. Chaque impulsion radiofréquence (angle d'impulsion de 90°) est suivie d'un temps d'acquisition de 1.016 s et d'un temps de récupération de 2.8 s. La somme de ces acquisitions se fait par blocs de 1600 scans.

IV.2.2.1.2.3. Traitement du signal

L'analyse du signal ou Free Induction Decay (FID) obtenue en 16K points est effectuée sur une station de calcul Bruker X32. La FID est filtrée (Line Broadening = 3 Hz) pour améliorer le rapport signal/bruit. Le signal en mode fréquentiel est ensuite obtenu par transformée de Fourier. Le phasage automatique est effectué sur le pic le plus intense. La PCr est choisie comme référence interne de déplacement chimique (0 partie par million) (ppm). Une ligne de base est placée dans le milieu du bruit observé entre +10 et -20 ppm (limites du spectre). L'analyse spectrale est basée sur la mesure des aires sous la courbe de chaque pic. Les résultats sont exprimés en terme de concentrations relatives par rapport à la surface totale des pics du spectre (TP).

IV.2.2.2. Identification biochimique

IV.2.2.2.1. Étape de titration

Cette expérience consiste à mesurer le déplacement chimique en fonction du pH de différentes solutions modèles de composés susceptibles de résonner dans la région des PDE. Les composés utilisés sont des PDE : L- α -glycérophosphoryl -éthanolamine (GPE), -sérine (GPS), -inositol (GPI) et -choline (GPC) et un phosphomonoester (PME) : DL- α -glycérophosphate (GP).

Les PDE standards sont tout d'abord lyophilisés afin d'éliminer le méthanol dans lequel ils sont conservés. En effet, la présence de méthanol dans les échantillons étudiés par SRM pourrait induire de faibles déplacements chimiques. Ensuite ces composés sont resuspendus dans du D₂O de façon à obtenir une concentration finale de 5 mg/ml. Le GP est directement resuspendu dans du D₂O et sa concentration finale est 200 mg/ml.

Pour toutes les expériences de cette étape nous avons utilisé du méthylène diphosphonate 0.1 mol/l dans du TRIS 0.1 mol/l à pD 8.3 comme référence interne.

L'étape de titration est effectuée en deux parties : tout d'abord directement sur les solutions modèles dans le D₂O et ensuite sur les solutions modèles ajoutées à un extrait PCA d'un muscle de patient HMS.

Pour l'analyse directe sur les solutions modèles dans le D₂O, 350 μ l de la solution de chacun des composés sont introduits dans un tube SRM de 5 mm de diamètre puis sont analysés par SRM ³¹P à différentes valeurs de pD : 6, 8 et 10. Entre chaque acquisition la nouvelle valeur de pD est ajustée au moyen de solutions de NaOD et DCl.

De même pour la titration dans l'extrait PCA, les solutions modèles sont ajoutées l'une après l'autre et entre chaque acquisition le pD est ajusté aux mêmes valeurs que précédemment.

IV.2.2.2.2. Étape de corésonance

Cette étape consiste à ajouter à un extrait PCA d'un muscle de patient HMS dont le pD = 8, les différentes solutions modèles citées ci-dessus et de voir laquelle entraîne une augmentation d'intensité du pic situé dans la région des PDE et résonnant à 3 ppm de la PCr. Pour cela, 50 μ l de GPC, GPE, GPI, GPS et 60 μ l de GP sont ajoutés successivement. Après chaque addition, le pD est ajusté si nécessaire à 8 avant l'acquisition du spectre. Ensuite, une fois tous les composés ajoutés, le pD du PCA est amené à 6 puis à 10 et de nouveaux spectres ³¹P sont acquis.

IV.2.2.3. Analyse lipidique par chromatographie

Cette étape a été réalisée en collaboration avec le service de Biochimie A du CHU de Grenoble (Pr. Chambaz).

IV.2.2.3.1. Extraction des lipides totaux

La biopsie encore congelée est pesée, broyée comme pour l'extraction perchlorique puis introduite sous forme de poudre dans un broyeur de potter. Elle est ensuite homogénéisée dans 500 μ l d'eau distillée. Huit millilitres d'hexane/isopropanol (HIP ; 3/2) sont directement introduits dans le broyeur de potter. Ces deux solvants sont moins toxiques que le chloroforme et le méthanol habituellement utilisés pour ce type d'extraction et permettent une extraction aussi complète [Kolarovic 1986].

Dans un tube à vis en Pyrex, 100 μ l d'acétate de cholestérol (CA) à 1 mg/ml tiennent lieu de standard interne (SI). Le tube est mis à évaporer sous azote. Le contenu du broyeur de potter est mis dans le tube en verre, une fois le solvant du CA évaporé. Le tube est bouché, agité sur Vortex puis sur agitateur rotatif pendant 30 min. Ensuite le tube est centrifugé (Beckman TJ-6, rotor TH4) pendant 10 min à 4000 rpm.

Une partie du surnageant (7.2 ml) est déposée dans un autre tube en Pyrex et mis à évaporer sous azote. Le culot et les 0.8 ml de solvant restants sont repris par 4 ml du mélange HIP (rinçage) et à nouveau agités et centrifugés.

Quatre millilitres de surnageant sont prélevés, ajoutés au premier surnageant et l'ensemble est évaporé à sec sous azote. Le résidu d'évaporation à sec est repris par 3 ml de chloroforme/méthanol (C/M ; 2/1), puis centrifugé pendant 10 min à 4000 rpm.

Ensuite, 2.5 ml de surnageant sont introduits dans un tube Extrelut à fond conique qui est mis à évaporer à sec sous azote. Si le dosage des lipides ne peut se faire de suite, le tube peut être conservé au congélateur (-20°C).

IV.2.2.3.2. Identification des lipides

Les lipides contenus dans le muscle sont différents de ceux du sérum. Pour identifier tous les pics qui seront visualisés sur le tracé du spectromètre, il est nécessaire de comparer les lipides musculaires avec des solutions étalons. Ceci se fait au moyen de chromatographie sur couche mince sur plaque HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography).

Le dépôt des échantillons et des étalons est fait au déposeur automatique (AMAG Linomat IV). Puis la plaque est mise à migrer dans une cuve. Pour les phospholipides, la plaque est mise en contact avec un mélange de solvants polaires : méthyl acétate, propanol, chloroforme, méthanol, KCl (25 ; 25 ; 28 ; 10 ; 7). Celle des lipides neutres est mise en contact avec un mélange de solvants apolaires : hexane, éther, acide acétique (140 ; 40 ; 1). La migration est arrêtée lorsque le front du solvant est à 1 cm du haut de la plaque. Les plaques sont séchées puis révélées par projection, sous air comprimé, d'une solution aqueuse de rhodamine (3 mg/100 ml). Enfin la lecture est faite sous une lampe à rayons ultra-violet (UV).

IV.2.2.3.3. Quantification des lipides

Les échantillons sont déposés sur des rods qui sont de fines tiges de quartz recouvertes de silice. La séparation des différentes espèces biochimiques est faite par deux migrations successives pour séparer d'abord les lipides neutres puis les phospholipides. Après chaque migration, la quantification de chaque espèce est réalisée par un spectromètre à ionisation de flamme.

IV.2.2.3.3.1. Préparation de l'appareil

Le spectromètre utilisé pour la lecture des rods est un Iatroscan (TH 10). Il est alimenté par de l'hydrogène (1.3 atm) et de l'air (2000 ml/min). Il est relié à un enregistreur qui trace le spectre, repère les pics et calcule leur surface. Après ouverture de l'alimentation, la flamme du Iatroscan est allumée et l'enregistreur est réglé pour la vérification des rods.

IV.2.2.3.3.2. Préparation des cuves

Trois cuves sont utilisées :

- celle pour les lipides neutres contenant des solvants apolaires (hexane, éther et acide formique),
- celle pour les phospholipides contenant un mélange de solvants polaires (chloroforme, méthanol, eau et acide formique),
- celle à NaCl saturé pour saturer les rods.

IV.2.2.3.3.3. Brûlage des rods

Les mêmes rods sont utilisés plusieurs fois, donc il faut vérifier leur propreté par un brûlage avant le dépôt des échantillons.

IV.2.2.3.3.4. Dépôt des échantillons

Les tubes d'échantillons sont sortis du congélateur. Une fois décongelé, le culot est repris par 100 µl de C/M (2/1). Une centrifugation pendant 5 min à 2500 rpm peut être nécessaire s'il y a un dépôt. Le tube est ensuite conservé dans de la glace pilée. Sur chaque rod sont déposés 2 µl d'échantillon par un déposeur automatique (SES 3200/IS-01). Entre chaque échantillon, la seringue du déposeur est rincée avec du C/M (2/1).

IV.2.2.3.3.5. Première migration

Les rods sont introduits dans la cuve à NaCl saturé pendant 10 min puis dans la cuve des lipides neutres pendant 30 min, mais le temps de migration peut-être légèrement modifié en fonction de la vitesse de migration. En principe la migration est terminée lorsque le solvant atteint la graduation 10 du support des rods. La température optimale est 19-20°C. Une fois la migration terminée, les rods sont séchés 5 min à l'étuve (100°C).

IV.2.2.3.3.6. Lecture des rods au Iatroscan

Le support des rods est placé dans le Iatroscan. Le brûlage des rods n'est pas fait depuis le point de dépôt pour ne pas détruire les phospholipides qui eux n'ont pas encore migré. Chaque rod est brûlé et l'enregistreur trace le spectre et les références des différents pics.

IV.2.2.3.3.7. Deuxième migration

Après brûlage des lipides neutres, les rods sont placés dans la cuve des phospholipides. Le temps de migration est de 50 ± 5 min. Ensuite ils sont passés 5 min à l'étuve, puis brûlés une deuxième fois, à partir du point de dépôt pour le dosage des différents phospholipides.

IV.2.2.3.3.8. Analyse des spectres

La surface de chaque pic est donnée par rapport à la surface totale des pics du spectre (T_{pl} pour les phospholipides, T_{ln} pour les lipides neutres). Donc chaque espèce sera exprimée en valeur relative.

IV.2.2.4. Analyse histologique

L'analyse histologique est effectuée dans le laboratoire de pathologie cellulaire du CHU de Grenoble par microscopie optique et électronique (P. Mézin). La proportion de chaque type de fibre est déterminée après mise en contact du tissu avec une ATPase myofibrillaire à pH 4.35 suivie d'une contre coloration au bleu de toluidine. L'analyse morphométrique par analyseur d'image permet de déterminer leur diamètre moyen. La surface moyenne d'un type de fibre est calculé par le produit du rayon de la fibre avec π . Seules les caractéristiques des fibres de type I ont été retenues.

IV.2.2.5. Analyse SRM *in vivo*

Cette analyse est faite en vue de la validation d'un score pronostique de l'HM. Certains résultats de cette analyse seront utilisés pour les corréler avec ceux trouvés *in vitro*. L'analyse est réalisée dans un aimant de 2.35 T avec une bobine de surface de 6 cm de diamètre au contact des muscles du mollet au repos. Chaque impulsion est suivie d'un temps de relaxation de 20 s. L'analyse des spectres est identique à celle faite *in vitro*.

IV.2.2.6. Analyse statistique

Chaque valeur est exprimée par sa moyenne \pm SD. La comparaison des résultats entre extraits HMS et sujets HMN s'effectue par le test non paramétrique de Mann et Whitney. Les études de corrélation sont effectuées par la régression non paramétrique de Spearman. Dans tous les cas, le seuil statistique significatif choisi est $p < 0.05$.

IV.3. Résultats

IV.3.1. Identification de la résonance des PDE

IV.3.1.1. Étape de titration

Les résultats de cette étape sont représentés sur la figure IV.4. Le déplacement chimique du GP n'a pas été représenté puisque ces valeurs sont au delà de celles des autres solutions modèles (le GP étant un PME). Dans le D₂O son déplacement chimique est respectivement de 5.55 ; 7.55 et 7.58 pour les trois valeurs de pD 6, pD 8 et pD 10. Dans l'extrait perchlorique, pour ces mêmes valeurs de pD, ce déplacement est respectivement de 5.85 ; 7.43 et 7.50.

Le déplacement chimique du PDE inconnu d'un extrait perchlorique d'un muscle HMS figure aussi sur cette figure et il est très voisin du profil de la courbe de la GPC. Ceci sera confirmé par l'étape de corésonance qui suit.

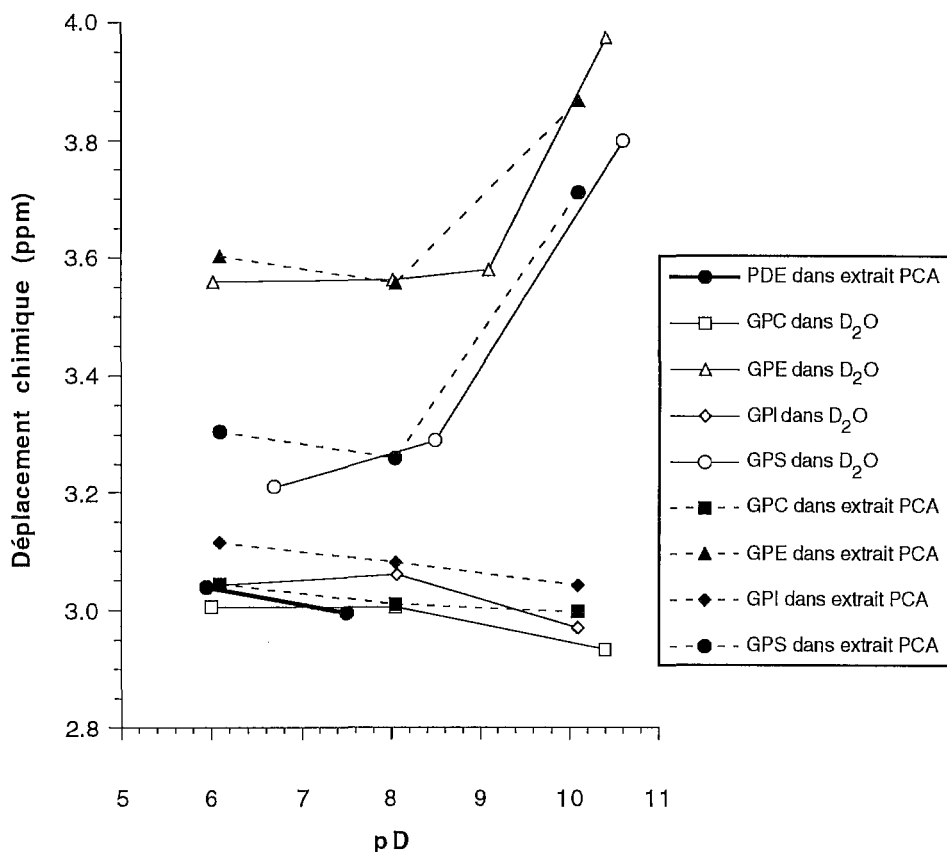


Figure IV.4. Déplacement chimique de solutions modèles en fonction du pD de la solution dans du D₂O et dans un extrait perchlorique de muscle de sujet HMS.

IV.3.1.2. Étape de corésonance

Lors de l'analyse d'un premier spectre issu d'un extrait perchlorique de muscle HMS, un pic a bien été retrouvé dans la région des PDE (Figure IV.5. A). L'addition des différentes solutions modèles à cet extrait a permis de confirmer le fait qu'il s'agit bien du pic de GPC puisque l'addition de ce composé entraîne l'apparition d'un pic résonant à la même fréquence que le PDE inconnu (Figure IV.5. B), ce qui n'est pas le cas des autres composés.

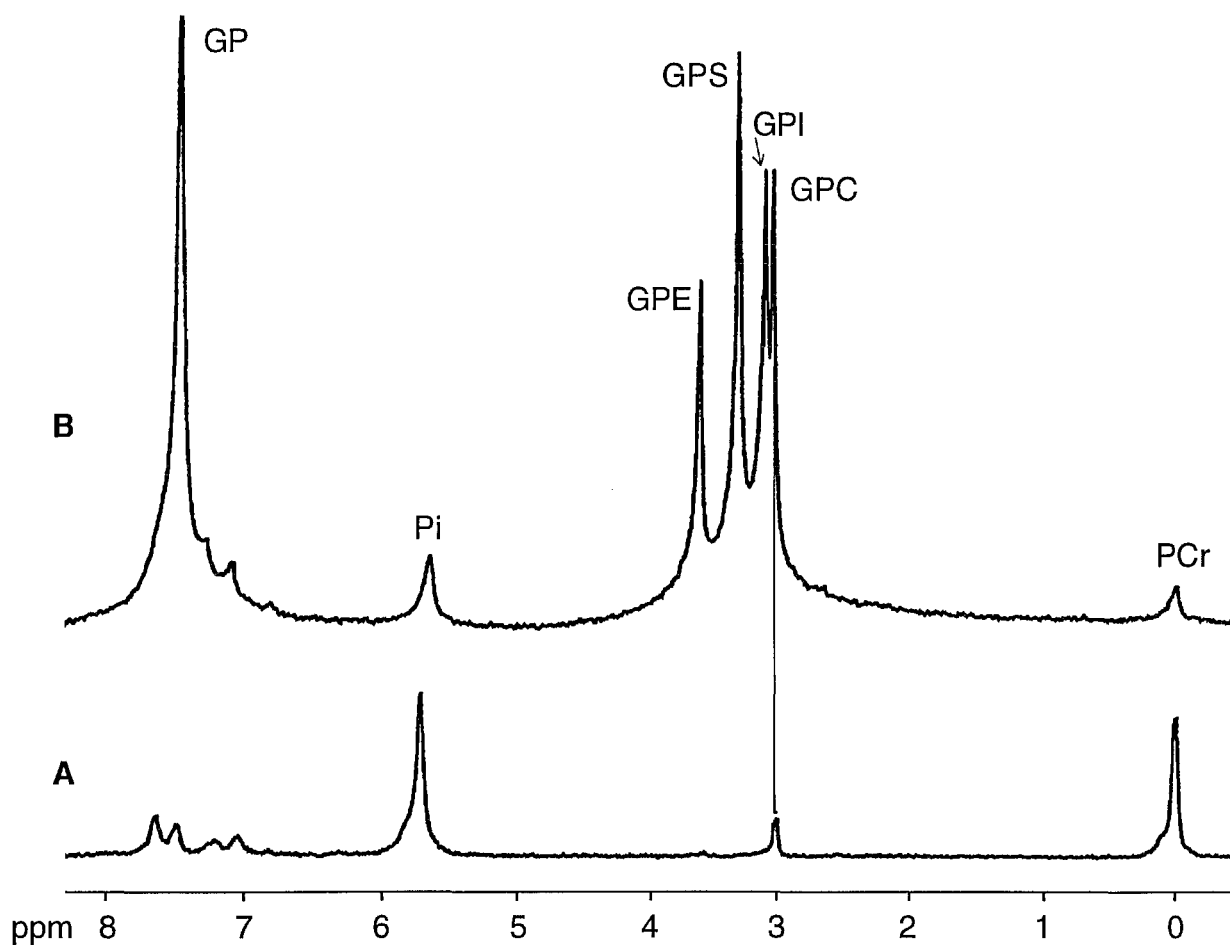


Figure IV.5. Spectre d'un extrait perchlorique de muscle HMS avant (A) et après (B) addition des différentes solutions standards.

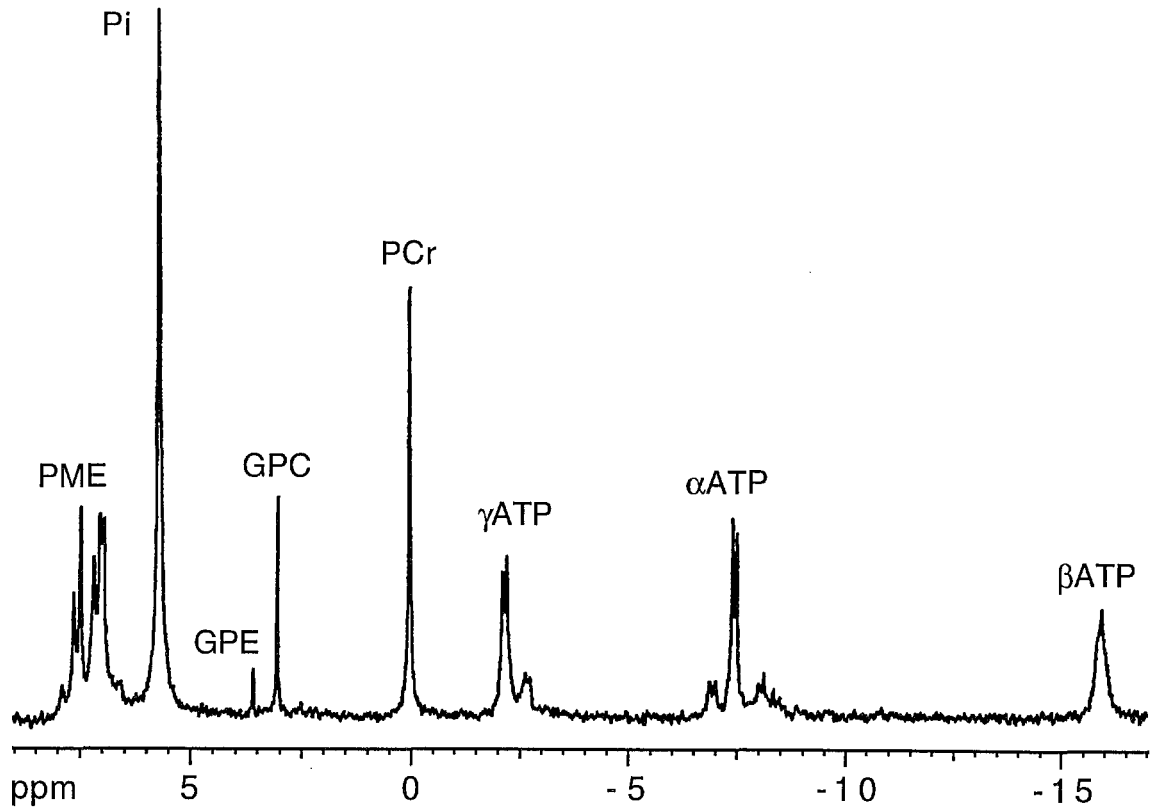


Figure IV.6. Spectre RMN ^{31}P *in vitro* d'un extrait musculaire de sujet HMN.

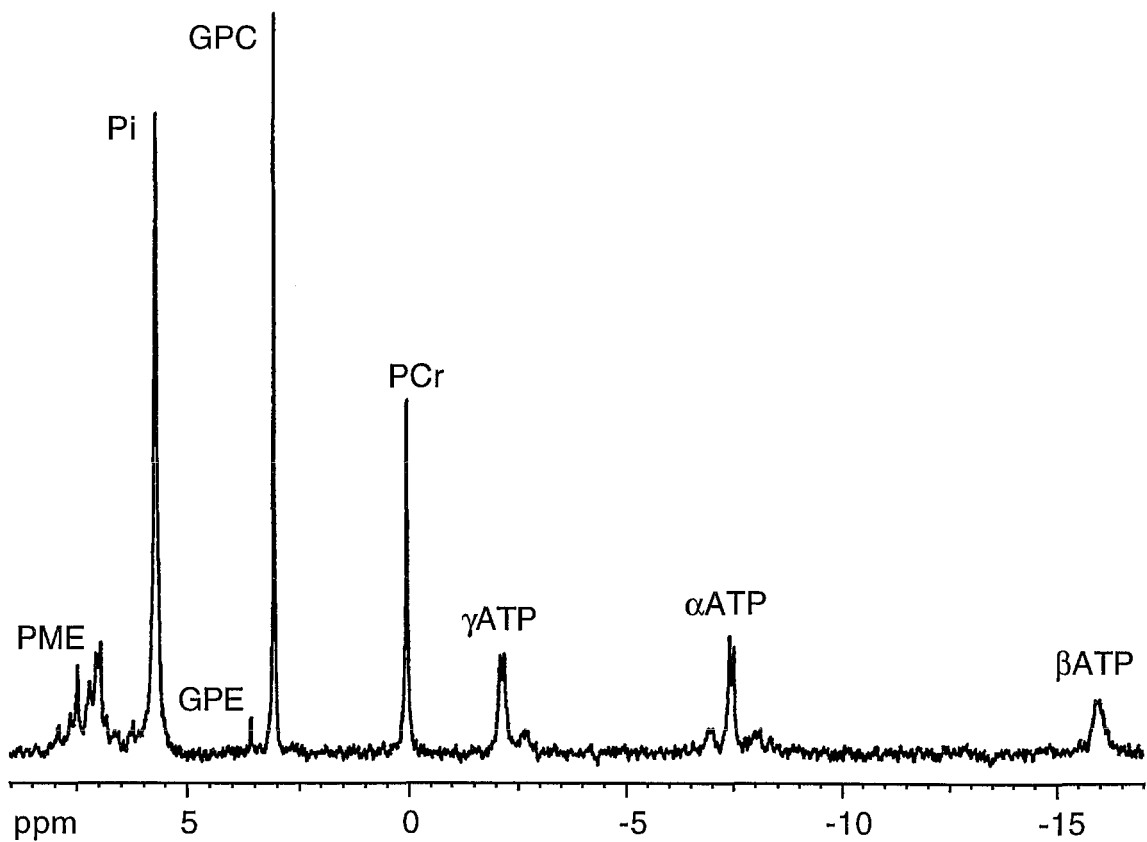


Figure IV.7. Spectre RMN ^{31}P *in vitro* d'un extrait musculaire de sujet HMS.

IV.3.2. Analyse par SRM des extraits perchloriques

Trente sept sujets ont été biopsiés et répartis en deux groupes selon leur susceptibilité à l'HM déterminée par le test de contracture *in vitro* (les sujets HME ont été exclus de l'étude).

- Le groupe HMN est composé de 21 patients (dont deux britanniques) âgés de 12 à 67 ans (médiane à 28 ans). Quatorze patients ont bénéficié du test SRM *in vivo* et 7 de l'analyse histologique.

- Le groupe HMS contient 16 patients (dont cinq britanniques) âgés de 16 à 63 ans (médiane à 32 ans). Pour 9 d'entre eux nous disposons du test SRM *in vivo* et de l'analyse histologique.

L'extrait perchlorique d'un sujet du groupe HMS a servi pour l'étape de corésonance présentée ci-dessus.

IV.3.2.1. Spectres RMN

Un spectre phosphore est caractérisé par un petit nombre de résonances sur une grande étendue spectrale. Figures IV.6 et IV.7 sont représentés respectivement les spectres d'un extrait PCA de biopsie de sujet HMN et d'un sujet HMS. De champ faible à champ fort se trouvent les résonances des PME (6.5 à 8.5 ppm), du Pi (5.7 ppm), de la GPE (3.5 ppm) (déterminée aussi par l'étape de corésonance), de la GPC (3 ppm), de la PCr (0 ppm) et des γ ATP (-2.2 ppm), α ATP (-7.5 ppm), et β ATP (-15.9 ppm).

Sur le spectre de l'extrait HMS la résonance de la GPC est plus intense que dans le spectre de l'extrait HMN et le rapport de l'aire de cette résonance et de la somme des aires de tous les composés phosphorylés est égal à 0.177 pour le spectre HMS et 0.030 pour le spectre HMN.

IV.3.2.2. Comparaison HMS - HMN

Pour établir cette comparaison, différents paramètres ont d'abord été étudiés un à un et il est apparu que certains d'entre eux variaient en fonction du délai entre la biopsie et l'extraction perchlorique. Donc ne sont présentés ici que les résultats issus des biopsies dont l'extrait PCA a été pratiqué au plus 5 mois après le prélèvement.

L'ensemble de ces résultats est exprimé dans le tableau IV.1. Plusieurs différences significatives sont mises en évidence entre les sujets HMS et HMN ; il s'agit des rapports PME/TP, GPC/TP et GPC/(Pi+PCr) ($p < 0.05$). En revanche il n'y a pas de différence significative pour les rapports (Pi+PCr)/TP et Σ ATP/TP où Σ ATP est la somme des aires des trois ATP (γ , α et β).

Paramètres SRM	Patients HMS (n = 9)	Patients HMN (n = 10)
PME/TP	0,196 \pm 0,128 *	0,061 \pm 0,047
GPC/TP	0,065 \pm 0,053 *	0,027 \pm 0,021
(Pi+PCr)/TP	0,453 \pm 0,137	0,546 \pm 0,110
Σ ATP/TP	0,327 \pm 0,197	0,356 \pm 0,125
GPC/(Pi+PCr)	0,140 \pm 0,100 *	0,050 \pm 0,040

Tableau IV.1. Principaux résultats de paramètres SRM observés dans les extraits PCA de biopsies musculaires de patients HMS et HMN. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SD. * Différence significative entre les deux groupes par le test non paramétrique de Mann et Whitney.

IV.3.2.3. Comparaison *in vitro* - *in vivo*

Une étude de corrélation a été faite entre le rapport GPC/(Pi+PCr) *in vitro* et le rapport PDE/(Pi+PCr) *in vivo* (Figure IV.8) montrant un résultat significatif ($r' = 0.78$) $p < 0.005$. Seuls sont représentés ici les patients ayant eu un test de SRM *in vivo* et une extraction PCA de leur biopsie au plus tard 5 mois après le prélèvement c'est à dire 8 patients HMN et 8 HMS. Le test *in vivo* a été réalisé sur muscles du mollet tandis que l'extraction PCA a été faite sur le vaste interne de la cuisse.

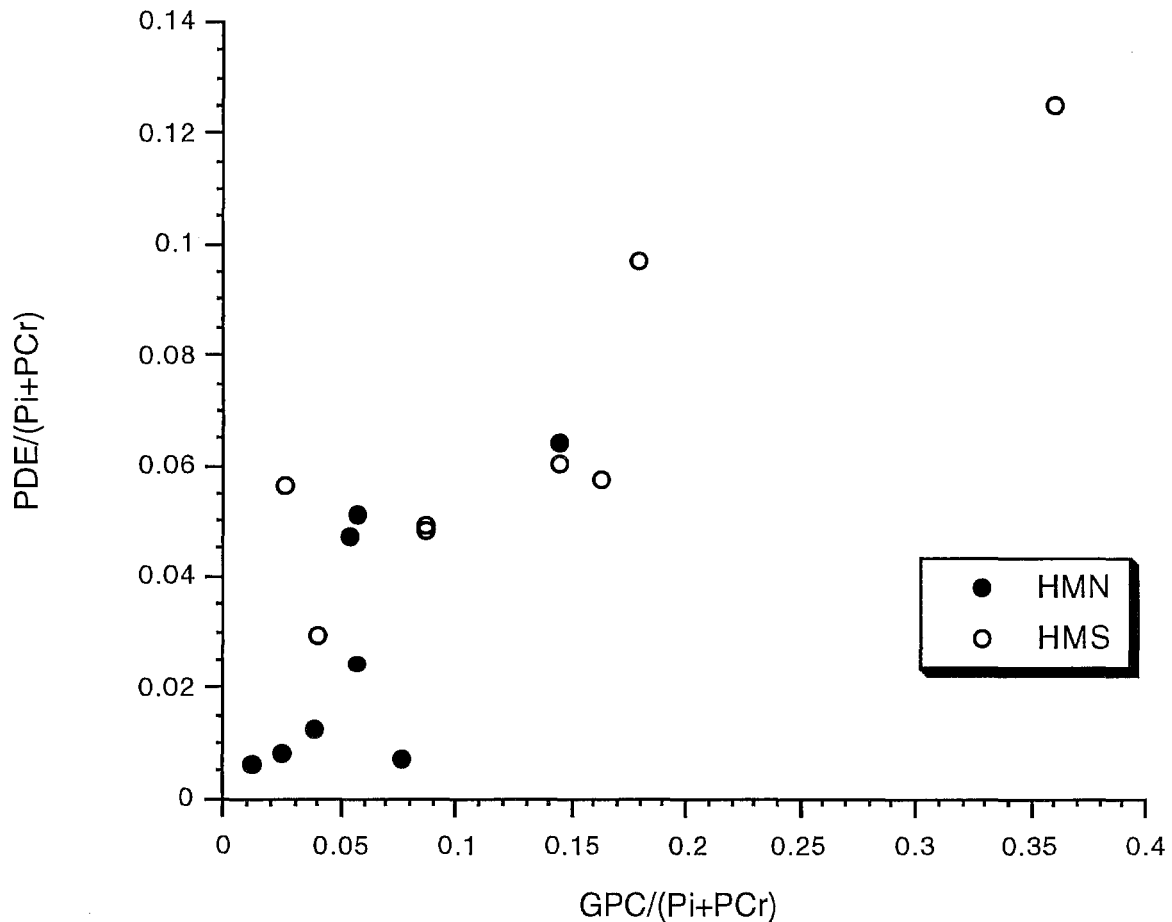


Figure IV.8. Étude de liaison entre les résultats SRM observés *in vivo* [PDE/(Pi+PCr)] et *in vitro* [GPC/(Pi+PCr)]. ($n = 16$; $r' = 0.78$ par corrélation de Spearman ; $p < 0.005$).

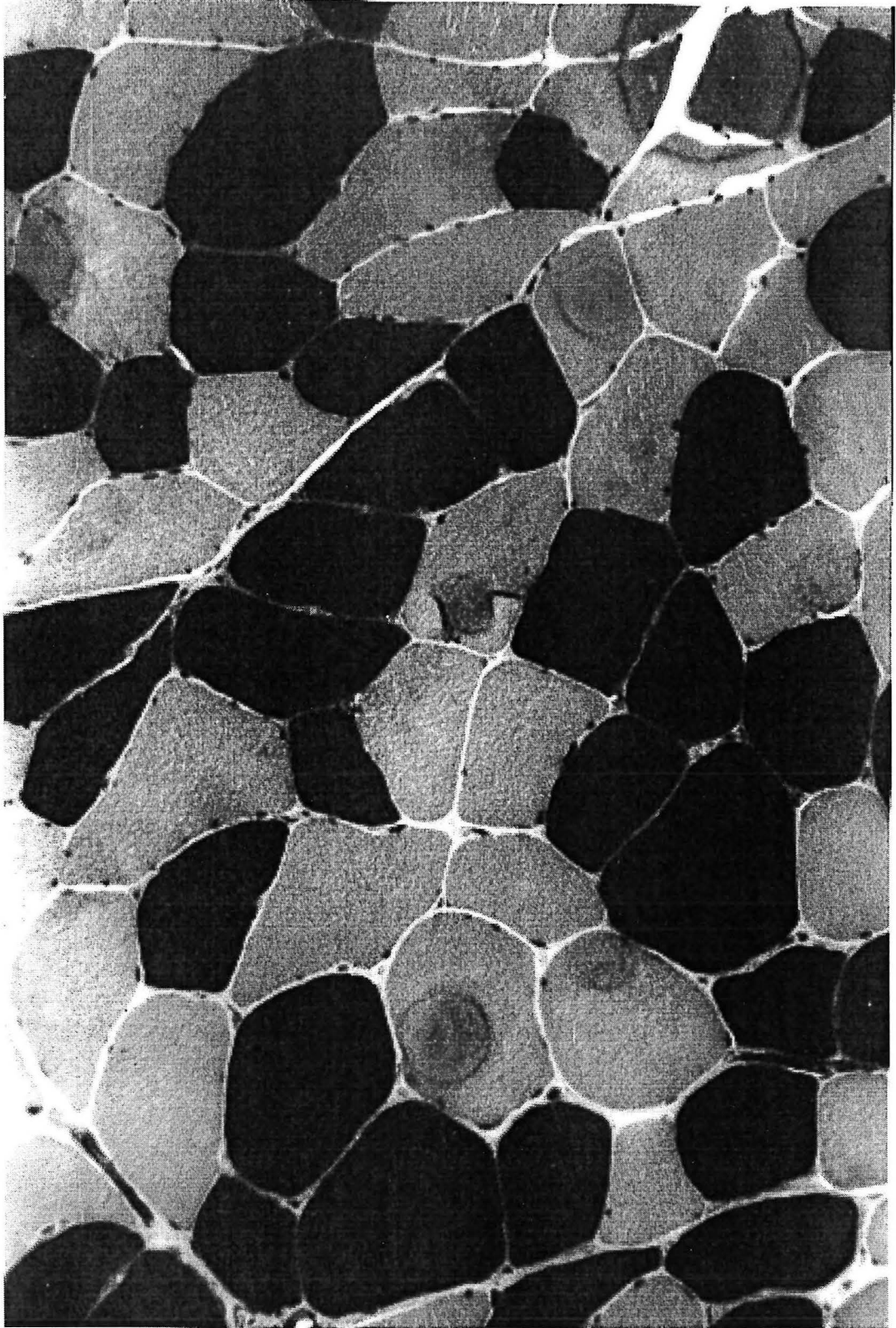


Figure IV.9. Aspect en microscopie photonique d'une coupe de fibres musculaires de sujet HMS après action de l'ATPase myofibrillaire et contre coloration par le bleu de toluidine.

Les fibres de type I apparaissent en foncé, les fibres de type II en clair.

IV.3.2.4. Corrélation GPC/histologie

Après action de l'ATPase myofibrillaire et contre coloration par le bleu de toluidine sur les fragments musculaires, les fibres de type I apparaissent en sombre et les fibres de type II en clair (Figure IV.9). Dans le tableau IV.2 se trouvent les différents résultats pour les seize patients ayant eu l'analyse histologique. Seuls les paramètres histologiques des fibres de type I sont montrés. Il n'y a pas de différence significative pour ces paramètres entre les sujets HMN et HMS.

Paramètres histologiques	Patients HMS (n = 9)	Patients HMN (n = 7)
Diamètre moyen des fibres de type I (μ)	63 \pm 7	57 \pm 8
Proportion des fibres de type I (%)	40,2 \pm 9,4	40,3 \pm 8,8
Surface moyenne des fibres de type I (μ^2)	3110 \pm 743	2579 \pm 620

Tableau IV.2. Résultats de paramètres histologiques observés chez les 16 patients ayant eu une analyse histologique de leur biopsie musculaire. Test non paramétrique de Mann et Whitney. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SD.

Une régression simple a été faite entre GPC/TP et la surface moyenne d'une fibre de type I pour les 13 patients (5 HMN et 8 HMS) ayant eu une analyse histologique et une extraction PCA de leur biopsie dans un délai maximal de 5 mois. Le rapport GPC/TP n'est pas corrélé avec la surface moyenne d'une fibre de type I ($r' = 0.068$).

IV.3.3. Analyse lipidique par chromatographie

L'analyse porte sur quatre patients HMN et cinq patients HMS.

Pour l'extraction des trois premières biopsies, trois poids différents ont été choisis pour évaluer la quantité de matériel nécessaire lors des extractions suivantes. Trente milligrammes paraissent suffisants pour cette technique.

IV.3.3.1. Identification des lipides musculaires

Pour les lipides neutres, les témoins déposés sont : cholestérol libre (CL), cholestérol estérifié (CE), triglycéride (trioléine), diglycéride (dioléine), monoglycéride (monooléine), acide gras (acide oléique) et squalène (SQ).

Après révélation de la plaque et comparaison avec les témoins on peut voir apparaître du CL, des triglycérides (TG), des acide gras (AG) dans les extraits de toutes les biopsies mais pas de squalène. Le CE est présent dans quatre biopsies (une HMS et trois HMN).

Sur la plaque des phospholipides les extraits de biopsies sont déposés en même temps que les solutions témoins suivantes : lysolécithine (LL), lécithine ou phosphatidylcholine (L), sphingomyéline (S), cardiolipides (Cdlp), phosphatidylinositol (PdyII), phosphatidylsérine (PdyIS), phosphatidylglycérol (PdyIG), phosphatidyléthanolamine (PdyIE) et acide phosphatidique.

Après révélation de la plaque, sont mis en évidence à partir du point de dépôt S, L, PdyIS, CA, Cdlp, PdyIE dans les extraits de toutes les biopsies. En revanche, il n'y a pas de PdyIG, LL, ni PdyII, ce dernier pouvant être masqué par la L.

IV.3.3.2. Quantification des lipides musculaires

Pour les lipides neutres (Figure IV.10), à partir du point de dépôt il y a le CL, les AG, les TG, le SI, et enfin le CE. Dans le muscle, la quantité de TG est tellement importante que leur pic englobe celui des AG.

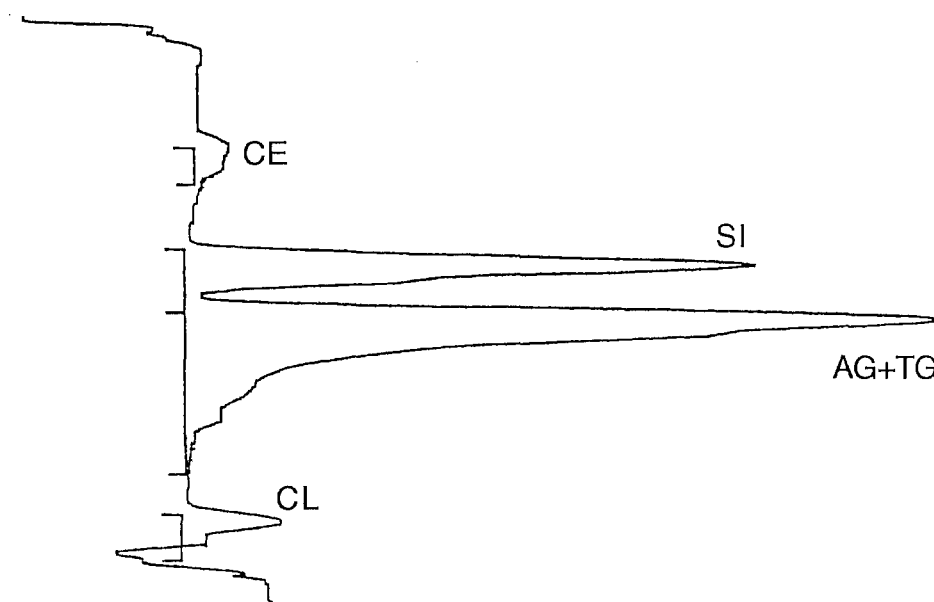


Figure IV.10. Spectre des lipides neutres en ionisation de flamme après extraction lipidique.

Pour les phospholipides (Figure IV.11), à partir du point de dépôt il y a la LL, la S, la L qui peut avoir un pic dédoublé, le PdyII (dont le pic n'est pas toujours intégré du fait de sa petite surface), la PdyIS, la PdyIE et les Cdlp.

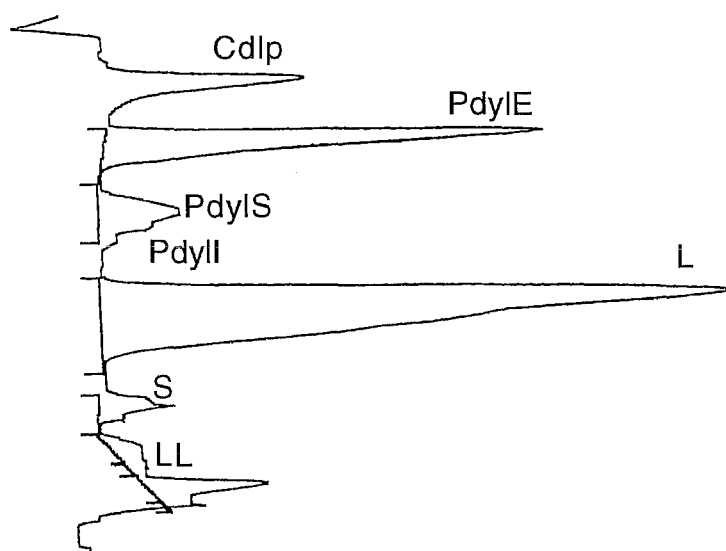


Figure IV.11. Spectre des phospholipides en ionisation de flamme après extraction lipidique.

Le tableau IV.3 montre la proportion des espèces biochimiques exprimée en valeur relative par rapport à la totalité des pics du spectre. Il n'y a aucune différence significative entre les sujets HMN et les sujets HMS. La LL a été seulement détectée par le spectromètre pour 5 biopsies (3 HMS et 2 HMN). Les valeurs relatives figurent dans le tableau IV.4.

Paramètres en ionisation de flamme	Patients HMS (n = 5)	Patients HMN (n = 4)
(TG+AG)/Tln	0,824 ± 0,152	0,816 ± 0,065
CL/Tln	0,103 ± 0,110	0,127 ± 0,059
PdylE/Tpl	0,173 ± 0,021	0,181 ± 0,011
PdylS/Tpl	0,062 ± 0,014	0,057 ± 0,005
L/Tpl	0,642 ± 0,094	0,567 ± 0,087
S/Tpl	0,035 ± 0,003	0,035 ± 0,011

Tableau IV.3. Principaux résultats de quantification des lipides observés dans les extractions lipidiques de biopsies musculaires de patients HMS et HMN. Test non paramétrique de Mann et Whitney. Les valeurs sont exprimées par la moyenne ± SD.

	Patients HMS (n = 3)	Patients HMN (n = 2)
LL/Tpl	0,013 ± 0,001	0,023 ± 0,003

Tableau IV.4. Proportion de LL dans le spectre total de phospholipides pour les 5 biopsies où elle a été détectée. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SD.

IV.4. Discussion

Le fait marquant de ce travail a été de retrouver une augmentation du rapport GPC/(Pi+PCr) *in vitro* chez les patients HMS confirmant ainsi l'anomalie métabolique mise en évidence pour ces mêmes sujets *in vivo*.

Pour pouvoir comparer les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* il faut que le profil biochimique des biopsies soit le plus proche possible de celui de l'état physiologique. La façon dont est effectué le prélèvement chirurgical peut induire des variations métaboliques notamment sur la PCr qui s'hydrolyse très rapidement. L'idéal serait de congeler *in situ* le tissu, ce qui n'est bien sûr pas réalisable *in vivo* chez l'homme. Le fragment musculaire destiné à l'analyse SRM est donc plongé le plus rapidement possible après le prélèvement dans l'azote liquide pour bloquer le métabolisme cellulaire. Toutes les étapes de l'extraction PCA se déroulent dans de la glace pilée et après la première centrifugation la neutralisation du pH doit être la plus rapide possible car le milieu acide favorise la dégradation de certaines espèces en particulier la PCr.

A partir des résultats issus des 37 patients certains rapports (GPC/TP et β ATP/TP) ont été étudiés en fonction du délai entre la biopsie chirurgicale et l'extraction PCA (résultats non montrés). Le rapport GPC/TP diminue au cours de la conservation pour les sujets HMS tandis qu'il augmente pour les sujets HMN ce qui tend à annuler la différence qui existe entre les deux groupes. Pour le rapport β ATP/TP il est stable dans le temps pour les sujets HMS tandis qu'il diminue franchement pour les sujets HMN ce qui entraîne au bout d'un certain temps une différence significative entre les deux groupes. Ces résultats nous ont conduits à envisager un délai maximal entre la biopsie chirurgicale et l'extrait PCA que nous avons fixé à 5 mois. C'est pour cette raison que sur les 37 patients ayant eu une analyse SRM *in vitro* seulement 19 ont été retenus pour la comparaison entre les sujets HMN et HMS.

Ces variations au cours du temps sont difficilement explicables puisque les biopsies sont conservées dans l'azote liquide c'est à dire à -196°C , température à laquelle toutes les réactions enzymatiques sont normalement inhibées. Une explication peut tout de même être envisagée : lorsque le niveau d'azote liquide dans le cryoconservateur est au minimum il est possible que certaines biopsies aient pu se trouver pendant un temps plus ou moins long hors de l'azote liquide et ainsi les réactions enzymatiques auraient pu reprendre. Dès lors, les biopsies ont été extraites très rapidement après le prélèvement.

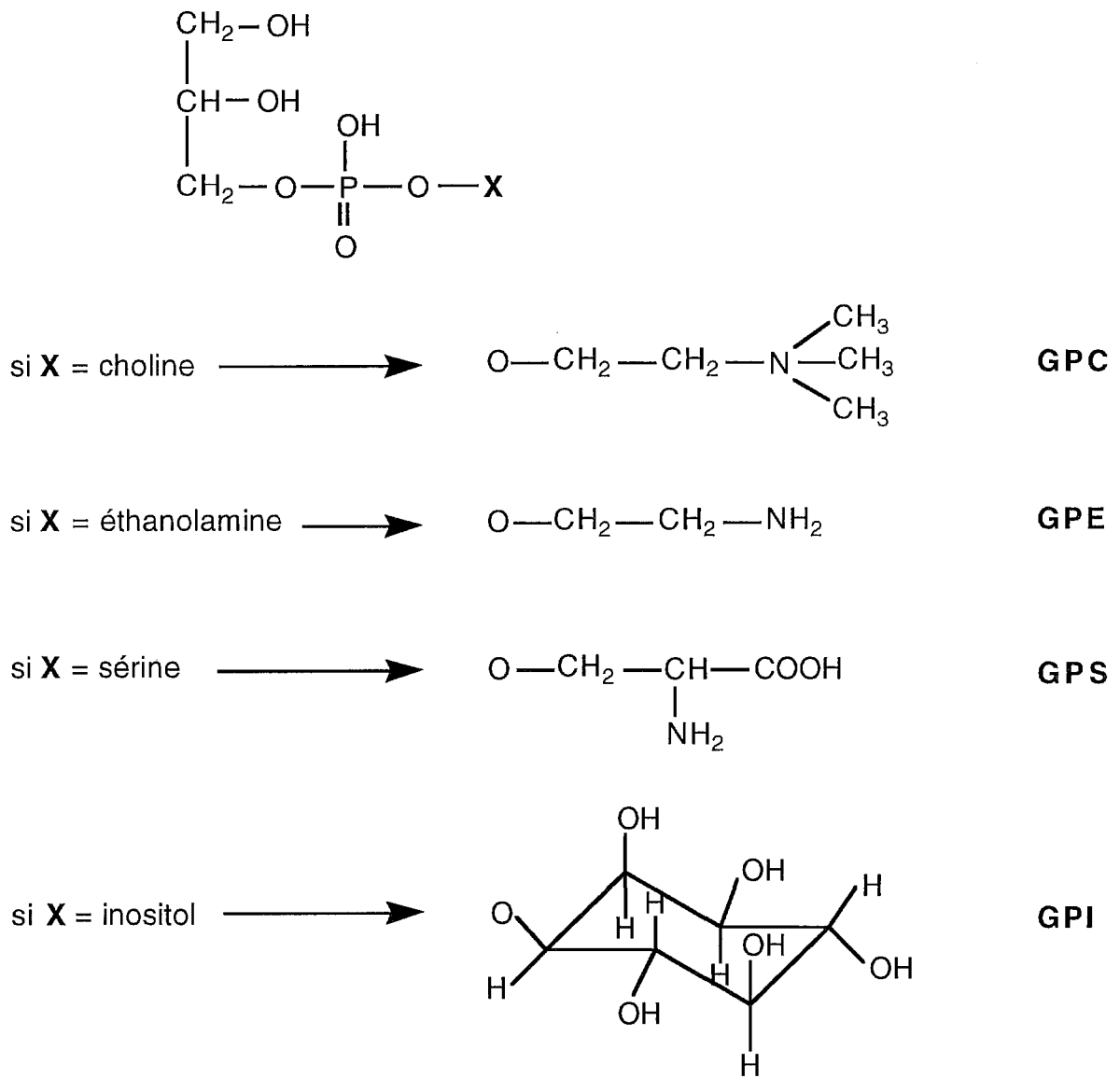


Figure IV.12. Structure chimique des phosphodiesteres.

Lors du calcul de la surface des pics, la PCr a été associée au Pi pour tenir compte des effets dus aux conditions de prélèvement. Les autres pics choisis sur le spectre RMN sont ceux de la GPC, des PME et la somme des trois ATP (γ , α , β). Habituellement c'est le β ATP qui est utilisé pour représenter la quantité d'ATP d'un tissu, mais *in vitro*, le β ATP est le moins bien résolu des trois car il est complexé à des ions (Mg^{2+} , Ca^{2+}). En général, ces ions sont chélatés par du CDTA introduit dans l'échantillon avant l'analyse SRM. Cela n'a pas été le cas ici car l'emploi de CDTA perturbe l'étude SRM par d'autres noyaux que l'on pourrait effectuer sur les mêmes échantillons.

L'étape de titration de solutions aqueuses de composés connus est faite pour démontrer que les fréquences de résonance à différentes valeurs de pD des pics contenus dans l'extrait sont les mêmes que celles des composés connus correspondants présents dans les solutions aqueuses [Glonek 1982]. C'est ainsi que la courbe de titration de la solution aqueuse de GPC est apparue très voisine de celle du PDE majoritaire inconnu apparaissant dans les spectres des extraits PCA (Figure IV.4).

Cette étape est très importante pour l'identification de composés car le déplacement chimique de certaines molécules est fortement soumis à la concentration en ions D^+ (ion deutérium) du milieu environnant. Si la molécule porte une fonction ayant un ion D^+ mobile comme dans les amines (Figure IV.12) cette molécule aura un déplacement chimique fortement dépendant du pD. Cela a été confirmé pour la GPE dont le déplacement chimique va de 3.56 à 3.98 pour un pD variant de 6.1 à 10.4 et pour la GPS dont le déplacement chimique varie de 3.21 à 3.8 pour un pD allant de 6.7 à 10.6. En revanche lorsque la molécule possède un groupement fonctionnel portant un ammonium quaternaire comme la GPC ou bien un groupement hydroxyl comme le GPI il n'y a pratiquement pas de modification du déplacement chimique en fonction du pD car il y a une protonation interne au sein de la molécule et celle-ci est moins sensible à la protonation externe due aux ions D^+ du milieu environnant.

L'identification du PDE est confirmée par l'étape de corésonance où l'addition de GPC standard entraîne une augmentation de l'intensité du pic préexistant.

Il y a quelques différences significatives entre les biopsies des patients HMN et HMS. Pourtant les patients du groupe HMN et ceux du groupe HMS sont comparables en nombre, âge, sexe et délai entre le prélèvement et l'extrait PCA. Pour l'analyse SRM nous avons pris certaines précautions pour le temps de répétition : nous l'avons choisi long (4.05 s) de manière à ce qu'il n'y ait pas d'effet de saturation (c'est à dire assurer le retour à l'équilibre de l'aimantation de toutes les espèces) qui pourrait être différent pour le même métabolite dans les biopsies HMS et HMN.

Parmi les rapports calculés, pour $(\text{Pi}+\text{PCr})/\text{TP}$ et $\Sigma\text{ATP}/\text{TP}$ il n'y a pas de différence significative entre les biopsies des deux groupes. Cela peut s'expliquer par le fait que la somme du Pi et de la PCr doit être constante puisqu'au cours de la dégradation de la PCr il y a formation de Pi, et le taux d'ATP doit aussi être constant tant que le taux de PCr n'est pas inférieur à un certain seuil.

En revanche, PME/TP , GPC/TP et $\text{GPC}/(\text{Pi}+\text{PCr})$ sont différents entre les biopsies HMS et HMN. Les PME sont un groupe constitué de nombreux composés comme les trioses phosphates, les hexoses phosphates aliphatiques, les pentoses phosphates, l'inosine et l'adénosine monophosphate, la choline et l'éthanolamine phosphate [Glonek 1982]. La choline et l'éthanolamine phosphate sont des marqueurs sensibles du métabolisme des phospholipides membranaires. Une augmentation de ces composés pourrait être liée à une détérioration des propriétés de la membrane cellulaire et par là même à celle du métabolisme des phospholipides. Cette hypothèse a déjà été suggérée pour l'HM [Ohnishi 1986, Rock 1990]. Mais aucune identification biochimique de la région des PME n'a été faite dans cette étude.

Comme la GPC est le composé majoritaire de la région des PDE dans les spectres *in vitro*, il paraît normal que le rapport GPC/TP soit plus élevé dans les biopsies HMS que dans les biopsies HMN. De plus, le rapport $\text{GPC}/(\text{Pi}+\text{PCr})$ est aussi plus élevé chez les patients HMS que chez les patients HMN.

L'intérêt de ces résultats est de suggérer qu'une quantité élevée de GPC dans le muscle pourrait être reliée à la sensibilité HM.

Une hypothèse de l'augmentation du rapport GPC/TP est que la GPC est plus abondante dans les fibres musculaires de type I [Burt 1982]. Le diamètre moyen, la proportion des fibres de type I ainsi que leur surface moyenne ont été calculés pour 16 biopsies. Il n'y a pas de différence entre les sujets HMS et HMN comme rapporté par une autre étude [Heimann-Patterson 1987]. Nous n'avons pas pu établir de corrélation entre les paramètres histologiques et la valeur relative de GPC contenue dans les biopsies.

Un sujet HMN a été exclu de l'étude car il comportait des anomalies musculaires à l'analyse histologique. En revanche, les 37 autres sujets n'ont aucun signe de myopathie spécifique.

Seize patients (8 HMS et 8 HMN) ont eu le test de SRM ^{31}P *in vivo*. Pour chacun il a été possible de comparer les résultats *in vitro* et *in vivo* malgré certaines différences entre les deux méthodes : -*in vivo* c'est l'ensemble des PDE qui est retenu alors qu'*in vitro* c'est seulement l'espèce majoritaire de ce groupe c'est à dire la GPC ; -les deux tests sont effectués sur des muscles différents : le mollet (*in vivo*) et le vaste interne de la cuisse (*in vitro*). Malgré ces différences, l'étude du rapport $\text{PDE}/(\text{Pi}+\text{PCr})$ *in vivo* et du rapport $\text{GPC}/(\text{Pi}+\text{PCr})$ *in vitro* a montré qu'il y avait une corrélation étroite entre ces deux paramètres et renforce l'intérêt de l'anomalie des PDE visible *in vivo*.

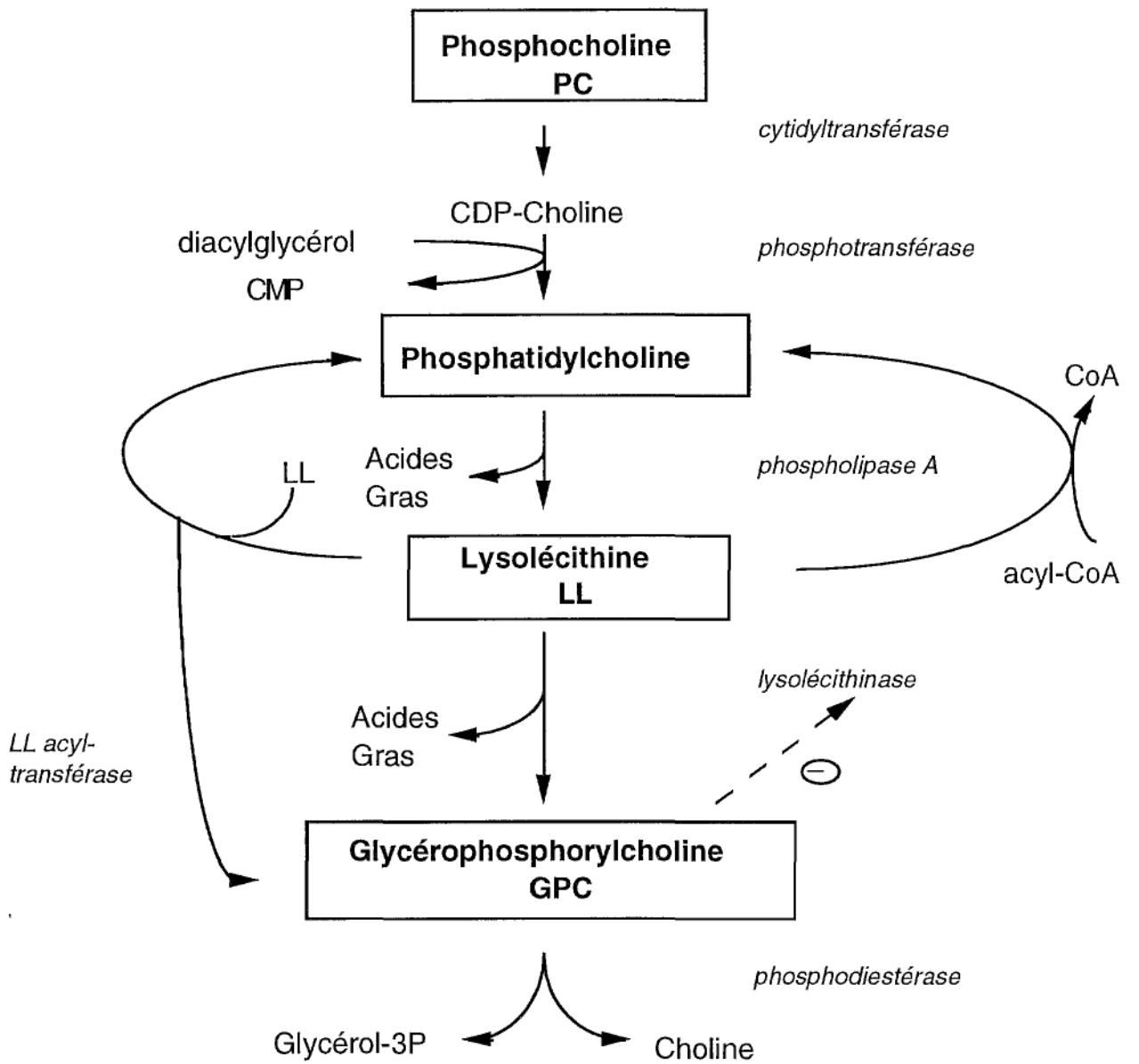


Figure IV.13. Métabolisme de la GPC, d'après Burt 1984.

Les résultats *in vitro* confirment donc les résultats *in vivo*. Ceci prouve que la GPC contribue aux variations de PDE vues *in vivo* même si d'autres espèces biochimiques dans ce groupe de composés (GPE, GPI, GPS) peuvent elles aussi y participer. Donc l'analyse *in vivo* peut être poursuivie pour une éventuelle utilisation comme test diagnostique.

La GPC est un métabolite hydrosoluble issu de la dégradation des phospholipides membranaires, formé à partir de la LL par deux voies métaboliques : la lysolécithinase et la lysolécithine-lysolécithine acyltransférase (Figure IV.13). Il est possible qu'une augmentation de GPC traduise, par son action inhibitrice sur la lysolécithinase, une accumulation de LL [Burt 1984]. La LL augmente la perméabilité membranaire. Or dans l'HM, la question d'une altération de la perméabilité membranaire du sarcolemme et/ou du RS fait l'objet de nombreux travaux [Ohnishi 1986, Rock 1990]. Le rôle exact de la GPC n'est pas bien connu. Des concentrations élevées de GPC ont été observées dans des modèles animaux de dystrophies musculaires [Chalovich 1979] ainsi que dans des pathologies très diverses (maladie d'Alzheimer, fibrosarcome...) [Carpinelli 1984, Miatto 1986, Podo 1987]. A l'origine de ces affections, une altération des propriétés membranaires de la cellule a été suggérée, faisant intervenir le métabolisme des phospholipides.

Ces remarques nous ont donc amenés à envisager une étude biochimique des lipides musculaires. L'analyse biochimique des biopsies musculaires a d'abord comporté une extraction par HIP. Ce mode d'extraction permet de ne pas avoir de phase aqueuse qui pourrait gêner l'extraction de la LL qui a tendance, du fait de son caractère plus hydrophile que la L ou la Pdyle à rester en quantité non négligeable dans la phase aqueuse [Kolarovic 1986].

La LL est une espèce qui migre peu. De plus, comme elle semble être en quantité faible dans le muscle [Fletcher 1989], la surface de son pic n'a pas été calculée à chaque fois par le Iatroscan. La comparaison entre la migration sur rods et sur plaque HPTLC met en évidence l'absence de LL sur les plaques. L'étalon déposé sur la plaque est très fluorescent en lumière UV. Dans aucun des neuf muscles testés il n'y a eu de LL. La quantité de muscle extraite était certainement trop faible pour la faire apparaître. L'ionisation de flamme étant une technique plus sensible, la LL apparaît mais à de très faibles quantités, à la limite de la détection. Il semble donc nécessaire de trouver une autre technique pour continuer dans cet axe de recherche.

Pour les lipides neutres, il n'y a pas de différence significative entre les sujets HMS et HMN. La proportion d'AG libres n'a pu être séparée des TG. Cela aurait pu être intéressant car il a été montré que la production d'acides gras libres était élevée dans les mitochondries de porcs HMS [Cheah 1981] et dans les homogénats musculaires de sujets HMS [Fletcher 1986]. En revanche, dans d'autres études il n'a pas été trouvé de différence entre les porcs HMS et HMN pour les lipides neutres [Fletcher 1988]. Pour les phospholipides, la répartition est similaire chez les HMS et HMN chez l'animal comme chez l'homme [Fletcher 1989].

IV.5. Synthèse

L'analyse de la région des PDE des spectres RMN ^{31}P d'extraits PCA de muscles de patients HMS et HMN par expériences de titration et de corésonance a permis d'identifier l'espèce majoritaire de cette région : il s'agit de la GPC.

La concentration relative (GPC/Pi+PCr) dans les extraits musculaires a été plus élevée pour les sujets HMS.

Comme l'anomalie de répartition des fibres a été écartée, l'explication de cette anomalie est peut-être du côté du métabolisme mais l'étude sur les composés lipidiques que nous avons réalisée n'a pas permis de le montrer.

La présomption d'une anomalie métabolique confirmerait les résultats obtenus *in vivo* et il est souhaitable que l'établissement du score en cours se poursuive et que cela devienne, si ce score est validé, un test de dépistage de l'HM reconnu.

Pour continuer ce travail il faudrait améliorer la méthode que nous avons utilisée en modifiant l'étalonnage de l'ionisateur de flamme de façon à intégrer systématiquement tous les pics du spectre et arriver à un dosage de chaque espèce lipidique ou bien utiliser une autre technique qui permettrait de doser spécifiquement la LL.

Les différentes étapes conduisant à la formation de la GPC font appel à des enzymes dont il serait intéressant de mesurer les activités. Cela pourrait indiquer si l'augmentation de GPC est due à une accélération de sa synthèse ou bien à un ralentissement de sa dégradation.

Conclusions

CONCLUSIONS

Mémoire soutenu par M^{elle} Nathalie FOUILHÉ

L'hyperthermie maligne (HM) anesthésique est une myopathie infraclinique rare, génétiquement transmissible, déclenchée au cours d'une anesthésie générale par des agents pharmacologiques : gaz halogénés (comme l'halothane) ou curares dépolarisants. La crise d'HM est d'évolution potentiellement fatale. De nombreuses hypothèses sur l'étiopathogénie de l'HM ont été évoquées. Le facteur déclenchant de la crise d'HM est lié à une anomalie fonctionnelle du récepteur à la ryanodine, responsable d'une brusque élévation de la concentration intracytosolique de Ca^{2+} . Mais d'autres structures cellulaires pourraient aussi avoir un rôle dans l'étiopathogénie de l'HM, ce qui appuierait l'hypothèse génétique que l'HM n'est pas liée à une seule anomalie.

Le dépistage de la sensibilité à l'HM repose actuellement sur le test de contracture *in vitro* à partir d'une biopsie chirurgicale. La Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire du phosphore 31 (SRM ^{31}P) *in vivo* pourrait jouer le rôle de test de dépistage non invasif du caractère HM. Les principaux résultats ont montré une élévation plus importante du rapport phosphate inorganique/phosphocréatine (Pi/PCr) ainsi qu'une anomalie parmi les phosphodiesteres (PDE) chez les patients HM-sensibles (HMS).

Le but de ce travail a été d'essayer de répondre à plusieurs questions suite à ces résultats:

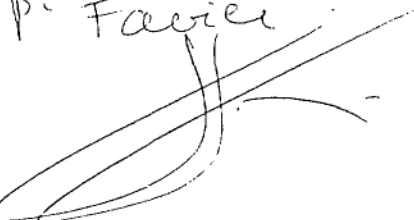
- quelle est l'espèce biochimique visualisée dans la région des PDE dans les spectres *in vivo*?
- l'augmentation de ce PDE était-elle vérifiée *in vitro* dans des extraits perchloriques de biopsies musculaires de sujets HMS?
- quelle pouvait être l'origine de cette différence de concentration en PDE (composition en fibres musculaires, modification du métabolisme des phospholipides...)?

L'étude par SRM ^{31}P *in vitro* de 19 extraits musculaires en milieu acide a permis d'identifier la glycérophosphorylcholine (GPC) comme étant l'espèce majoritaire de la région des PDE. La concentration relative de GPC [GPC/(Pi+PCr)] a été plus élevée pour les sujets HMS ($p < 0.05$). Ces résultats obtenus *in vitro* ont été corrélés avec ceux obtenus par SRM ^{31}P *in vivo* ($r' = 0.78$; $p < 0.005$). Aucune différence dans la proportion des fibres musculaires n'a été mise en évidence entre les groupes HMS et HM-négatifs (HMN). Ceci suggérerait une anomalie dans le métabolisme des phospholipides membranaires chez les sujets HMS. Nous avons essayé d'analyser par chromatographie sur couche mince et ionisation de flamme la répartition lipidique de 9 extraits musculaires. Le dosage de la lysolécithine, précurseur de la GPC, ne semble pas différent entre les groupes HMS et HMN.

L'ensemble de ces résultats serait plutôt en faveur d'une modification de l'activité enzymatique dans la voie de dégradation de la phosphorylcholine de la GPC chez les sujets HMS. Cela pourrait alors argumenter la thèse d'une augmentation de perméabilité membranaire chez les sujets HMS. Par ailleurs, ces résultats *in vitro* renforcent les constatations faites *in vivo* et l'intérêt de la SRM ^{31}P dans l'éventuel dépistage non invasif de la sensibilité à l'HM.

Le Président du Jury
(Nom et signature)

P. Faivre




VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

Vu, pour le Président de l'Université
Joseph Fourier GRENOBLE 1,
le Directeur de l'U.F.R. de Pharmacie

Vu, le Directeur de l'U.F.R.
de Pharmacie

Grenoble, le



J. ROCHAT



J. ROCHAT

Références bibliographiques

Allen PD, Lopez JR, Sanchez V, Ryan JF, Sreter FA. EU 4093 decreases intracellular $[Ca^{2+}]$ in skeletal muscle fibers from control and malignant hyperthermia-susceptible swine. *Anesthesiology* 1992, 76, 132-138.

Allsop P, Jorfeldt L, Rutberg H, Lennmarken C, Hall GM. Delayed recovery of muscle pH after short duration, high intensity exercise in malignant hyperthermia susceptible subjects. *Br J Anaesth* 1991, 66, 541-545.

Baillet J, Nortier E. Myocyte strié squelettique et synapse neuromusculaire. In : Précis de physiologie humaine. Paris, éd Marketing, 1992, 124-137.

Barany M, Siegel IM, Venkatasubramanian PN, Mok E, Wilbur AC. Human leg neuromuscular diseases : P-31 MR spectroscopy. *Radiology* 1989, 172, 503-508.

Bedane C, Bonnetblanc JM, Dudognon P, Labrousse C. Acné induite par le dantrolène. *Rech Dermatol* 1988, 1, 111-113.

Bianchine JR. Drugs for Parkinson's disease, spasticity and acute muscle spasms. In : Goodman Gilman A, Goodman LS, Rall TW, Murad F. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Pergamon Press, 8^{ed}, 1990, 479-482.

Blanck TJ, Peterson CV, Baroody B, Tegazzin V, Lou J. Halothane, enflurane, and isoflurane stimulate calcium leakage from rabbit sarcoplasmic reticulum. *Anesthesiology* 1992, 76, 813-821.

Britt BA. Dantrolene. *Can Anaesth Soc J* 1984, 31, 61-75.

Britt BA. Aetiology and pathophysiology of malignant hyperthermia. In : Britt BA. Malignant hyperthermia. Boston, éd Britt BA, 1987, 11-42.

Brownell AK. Malignant hyperthermia : relationship to other diseases. *Br J Anaesth* 1988, 60, 303-308.

Burt CT, Glonek T, Barany M. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance detection of unexpected phosphodiester in muscle. *Biochemistry* 1976, 15, 4850-4853.

Burt CT, Pluskal MG, Sreter FA. Generation of phosphodiester during fast-to-slow muscle transformation. A ^{31}P NMR study. *Biochim Biophys Acta* 1982, 721, 492-494.

Burt CT, Ribolow HJ. A hypothesis : noncyclic phosphodiester may play a role in membrane control. *Biochem Med* 1984, 31, 21-30.

Carpinelli G, Podo F, Di Vito M, Proietti E, Gessani S, Belardelli F. Modulations of glycerophosphorylcholine and phosphorylcholine in Friend erythroleukemia cells upon *in vitro*-induced erythroid differentiation : a ^{31}P NMR study. *F.E.B.S. Letters* 1984, 176, 88-92.

Chalovich JM, Burt CT, Danon MJ, Glonek T, Barany M. Phosphodiester in muscular dystrophies. *Ann NY Acad Sci* 1979, 317, 649-669.

Chambers FA, Casey W, Dowling F, Moore KP. Malignant hyperthermia during isoflurane anaesthesia. *Can J Anaesth* 1994, 41, 355-356.

Cheah KS, Cheah AM. Skeletal muscle mitochondrial phospholipase A2 and the interaction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in porcine malignant hyperthermia. *Biochim Biophys Acta* 1981, 638, 40-49.

Duthie GG, Wahle KW, Harris CI, Arthur JR, Morrice PC. Lipid peroxidation, antioxidant concentrations, and fatty acid contents of muscle tissue from malignant hyperthermia-susceptible swine. *Arch Biochem Biophys* 1992, 296, 592-592.

Eger EI. Desflurane animal and human pharmacology : aspects of kinetics, safety and MAC. *Anesth Analg* 1992, 75, S3-S9.

Ellis FR, Harriman DG, Keaney NP, Kyei-Mensah K, Tyrrell JH. Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia. *Br J Anaesth* 1971, 43, 721-722.

Ervasti JM, Claessens MT, Mickelson JR, Louis CF. Altered transverse tubule dihydropyridine receptor binding in malignant hyperthermia. *J Biol Chem* 1989a, 264, 2711-2717.

Ervasti JM, Mickelson JR, Lewis SM, Thomas DD, Louis CF. An electron paramagnetic resonance study of skeletal muscle membrane fluidity in malignant hyperthermia. *Biochim Biophys Acta* 1989b, 986, 70-74.

European malignant hyperpyrexia group. A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br J Anaesth* 1984, 56, 1267-1269.

Favard P. Microfilaments cytoplasmiques. In : Berkaloff A, Bourguet J, Favard P, Lacroix JC. *Biologie et physiologie cellulaires I*. Paris, éd Hermann, 1987, 139-162.

Fink HS, Hofmann JG, Hentschel H, Till U. Abnormalities in the regulation of blood platelet free cytosolic calcium in malignant hyperthermia. I. Human platelets. *Cell Calcium* 1992, 13, 149-155.

Firestone LL, Lebowitz PW, Cook CE. *Manuel d'anesthésie clinique*. Paris, éd Pradel, 3ème éd, 1988.

Fletcher JE, Rosenberg H. *In vitro* muscle contracture induced by halothane and suxamethonium. II : Human skeletal muscle from normal and malignant hyperthermia susceptible patients. *Br J Anaesth* 1986, 58, 1433-1439.

Fletcher JE, Rosenberg H, Michaux K, Cheah KS, Cheah AM. Lipid analysis of skeletal muscle from pigs susceptible to malignant hyperthermia. *Biochem Cell Biol* 1988, 66, 917-921.

Fletcher JE, Rosenberg H, Michaux K, Tripolitis L, Lizzo FH. Triglycerides, not phospholipids, are the source of elevated free fatty acids in muscle from patients susceptible to malignant hyperthermia. *Eur J Anaesthesiol* 1989, 6, 355-362.

Fletcher JE, Tripolitis L, Erwin K, Hanson S, Rosenberg H, Conti PA, Beech J. Fatty acids modulate calcium-induced calcium release from skeletal muscle heavy sarcoplasmic reticulum fractions : implications for malignant hyperthermia. *Biochem Cell Biol* 1990, 68, 1195-1201.

Foster PS, Gesini E, Claudianos C, Hopkinson KC. Inositol 1,4,5-trisphosphate phosphatase deficiency and malignant hyperpyrexia in swine. *Lancet* 1989a, 124-127.

Foster PS, Hopkinson K, Denborough MA. ³¹P-NMR spectroscopy : the metabolic profile of malignant hyperpyrexia porcine skeletal muscle. *Muscle Nerve* 1989b, 12, 390-396.

François G. Les anesthésiques volatils. In François G, Cara M, du Cailar J, d'Athis F, Gouin F, Poisvert M. *Précis d'anesthésiologie*. Ed Masson, Paris, 1985.

Frandsen A, Schousboe A. Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and Ca²⁺ release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 1991, 56, 1075-1078.

Gaillard S, Dufourc EJ, Bonnet M, Renou JP. Dantrolene inhibits halothane-induced membrane reorganisation. *Eur Biophys J* 1992a, 21, 13-19.

Gaillard S, Rock E, Vignon X, Dufour EJ, Renou JP. ³¹P NMR and freeze fracture studies of sarcoplasmic reticulum membranes from normal and malignant hyperthermic pigs : effet of halothane and dantrolene. *Arch Biochem Biophys* 1992b, 294, 154-159.

Gerdes C, Richter A, Annies R, Löscher W. Increase of serotonin in plasma during onset of halothane-induced malignant hyperthermia in pigs. *Eur J Pharmacol* 1992, 220, 91-94.

Glonek T, Kopp SJ, Kot E, Pettegrew JW, Harrison WH, Cohen MM. P-31 nuclear magnetic resonance analysis of brain : the perchloric acid extract spectrum. *J Neurochem* 1982, 39, 1210-1219.

Goldfarb G. Hépatite à l'halothane. *Ann Fr Anesth Reanim* 1982, 1, 629-633.

Gronert GA, Mott J, Lee J. Aetiology of malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 1988, 60, 253-267.

Halsall PJ, Ellis FR, Knowles PF. Evaluation of spin resonance spectroscopy of red blood cell membranes to detect malignant hyperthermia susceptibility. *Br J Anaesth* 1992, 69, 471-473.

Hayashi T, Kagaya A, Motohashi N, Yamawaki S. Possible mechanism of dantrolene stabilization of cultured neuroblastoma cell plasma membranes. *J Neurochem* 1994, 63, 1849-1854.

Heffron JJ. Malignant hyperthermia : biochemical aspects of the acute episode. *Br J Anaesth* 1988, 60, 274-278.

Heiman-Patterson T, Fletcher JE, Rosenberg H, Tahmouh AJ. No relationship between fiber type and halothane contracture test results in malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1987, 67, 82-84.

Heiman-Patterson TD, Rosenberg H, Fletcher JE, Tahmouh AJ. Halothane-caffeine contracture testing in neuromuscular diseases. *Muscle Nerve* 1988, 11, 453-457.

Herman R, Mayer N, Mecomber SA. Clinical pharmaco-physiology of dantrolene sodium. *Am J Physical Med* 1972, 51, 296-311.

Iaizzo PA, Lehmann-Horn F, Taylor SR, Gallant EM. Malignant hyperthermia : effects of halothane on the surface membrane. *Muscle Nerve* 1989a, 12, 178-183.

Iaizzo PA, Lehmann-Horn F. The *in vitro* determination of susceptibility to malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 1989b, 12, 184-190.

Iaizzo PA, Wedel DJ. Response to succinylcholine in porcine malignant hyperthermia. *Anesth Analg* 1994, 79, 143-151.

Iles DE, Lehmann-Horn F, Scherer SW, Tsui LC, Weghuis DO, Suijkerbuijk RF et al. *Hum Mol Genet* 1994, 3, 969-975.

Isaacs H, Badenhorst M. False-negative results with muscle caffeine halothane contracture testing for malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1993, 79, 5-9.

Jacquot C, Stieglitz P, Kozak-Reiss G, Krivosic-Horber R, Laxenaire MC, Lienhart A, Nivoche Y. Recensement des cas français d'hyperthermie maligne peranesthésique. *Mise à jour. Ann Fr Anesth Réanim* 1988, 7, 524-534.

Kalow W, Britt BA, Terreau ME, Haist C. Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia. *Lancet* 1970, 2, 895-898.

Kausch K, Grimm T, Janka M, Lehmann-Horn F, Wieringa B, Müller CR. Evidence for linkage of the central core disease locus to chromosome 19q (abstract). *J Neurol Sci* 1990, 98, 549.

Klip A, Ramlal T, Walker D, Britt BA, Elliot ME. Selective increase in cytoplasmic calcium by anesthetic in lymphocytes from malignant hyperthermia-susceptible pigs. *Anesth Analg* 1987, 66, 381-385.

Kochs E, Hoffman WE, Schulte am Esch J. Improvement of brain electrical activity during treatment of porcine malignant hyperthermia with dantrolene. *Br J Anaesth* 1993, 71, 881-884.

Kolarovic L, Fournier NC. A comparison of extraction methods for the isolation of phospholipids from biological sources. *Anal Biochem* 1986, 156, 244-250.

Kozak-Reiss G, Gascard JP, Herve P, Jehenson P, Syrota A. Malignant and exercise hyperthermia : investigation of 73 subjects by contracture tests and ^{31}P NMR spectroscopy (abstract). *Anesthesiology* 1988, 69, A415.

Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Liu QY, Meissner G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 1988, 331, 315-319.

Lamy M, Scherpereel P. *Pharmacologie en anesthésiologie*. Paris, éd Pradel, 1994.

Larach MG. Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test. *Anesth Analg* 1989, 69, 511-515.

Larach MG, Landis JR, Bunn JS, Diaz M. Prediction of malignant hyperthermia susceptibility in low-risk subjects. *Anesthesiology* 1992, 76, 16-27.

Laschuk MJ, Lee RJ, Zochodne DW, Drieger AL, Gordon K, Thomson T. ^{31}P NMR measured exercise-induced skeletal muscle acidosis in MHS individuals (abstract). *Can J Anaesth* 1987, 34, S65-S66.

Lee DL, Zhang JZ, Blanck TJ. The effects of halothane on voltage-dependent calcium channels in isolated langendorff-perfused rat heart. *Anesthesiology* 1994, 81, 1212-1219.

Lehmann-Horn F, Iaizzo PA. Are myotonias and periodic paralysis associated with susceptibility to malignant hyperthermia? *Br J Anaesth* 1990, 65, 692-697.

Levitt RC, Nouri N, Jedlicka AE, McKusick VA, Marks AR, Shutack JG, Fletcher JE, Rosenberg H, Meyers DA. Evidence for genetic heterogeneity in malignant hyperthermia susceptibility. *Genomics* 1991, 11, 543-547.

Lopez JR, Alamo L, Caputo C, Wikinski J, Ledezma D. Intracellular ionized calcium concentration in muscles from humans with malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 1985, 8, 355-358.

Lopez JR, Gerardi A, Lopez MJ, Allen PD. Effects of dantrolene on myoplasmic free $[\text{Ca}^{2+}]$ measured *in vivo* in patients susceptible to malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1992, 76, 711-719.

Löscher W, Gerdes C, Richter A. Lack of prophylactic or therapeutic efficacy of 5-HT_{2A} receptor antagonists in halothane-induced porcine malignant hyperthermia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1994, 350, 365-374.

Louis CF, Zualkernan K, Roghair T, Mickelson JR. The effects of volatile anesthetics on calcium regulation by malignant hyperthermia-susceptible sarcoplasmic reticulum. *Anesthesiology* 1992, 77, 114-125.

Louis CF, Roghair T, Mickelson JR. Volatile anesthetics inhibit dihydropyridine binding to malignant hyperthermia-susceptible and normal pig skeletal muscle membranes. *Anesthesiology* 1994, 80, 618-624.

MacCarthy TV, Healy JM, Heffron JJ, Lehane M, Deufel T, Lehmann-Horn F, Farrall M, Johnson K. Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature* 1990, 343, 562-564.

MacKenzie AE, Allen G, Lahey D, Crossan ML, Nolan K, Mettler G, Worton RG, MacLennan DH, Korneluk R. A comparison of caffeine halothane muscle contracture test with the molecular genetic diagnosis of malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1991, 75, 4-8.

MacLennan DH, Duff C, Zorzato F, Fujii J, Phillips M, Korneluk RG, Frodis W, Britt BA, Worton RG. Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature* 1990, 343, 559-561.

MacLennan DH, Phillips MS. Malignant hyperthermia. *Science* 1992, 256, 789-794.

Marshall BE, Wollman H. General anesthetics. In : Goodman Gilman A, Goodman LS, Rall TW, Murad F. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Pergamon Press, 8^{ed}, 1990, 286-292.

Martindale : The Extra Pharmacopoeia. London Pharmaceutical Press, 29^{ed}, 1989.

Martonosi AN. Mechanisms of Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Physiol Rev* 1984, 64, 1240-1306.

Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 11^{ed}, Rahway, Merck and Co. éd, 1989.

Mézin P. Muscular histological lesions in malignant hyperthermia. Annual meeting of the european malignant hyperthermia group (abstract). Annecy, 19-20 May 1995.

Miatto O, Gonzalez RG, Buonanno F, Growdon JH. *In vitro* ³¹P NMR spectroscopy detects altered phospholipid metabolism in Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci* 1986, 13, 535-539.

Mickelson JR, Ross JA, Reed BK, Louis CF. Enhanced Ca²⁺-induced release by isolated sarcoplasmic reticulum vesicles from malignant hyperthermia susceptible pig muscle. *Biochim Biophys Acta* 1986, 862, 318-328.

Mickelson JR, Thatte HS, Beaudry TM, Gallant EM, Louis CF. Increased skeletal muscle acetylcholinesterase activity in porcine malignant hyperthermia. *Muscle Nerve*, 1987, 10, 723-727.

Mickelson JR, Gallant EM, Litterer LA, Johnson KM, Rempel WE, Louis CF. Abnormal sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor in malignant hyperthermia. *J Biol Chem* 1988, 263, 9310-9315.

Nelson TE. Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in the malignant hyperthermia syndrome. In éd Britt BA, Martinus Nijhoff, Boston, 1987, 43-78.

Nelson TE, Sweo T. Calcium uptake and calcium release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Anesthesiology* 1988, 69, 571-577.

Nelson TE. Halothane effects on human malignant hyperthermia skeletal muscle single calcium-release channels in planar lipid bilayers. *Anesthesiology* 1992, 76, 588-595.

Newman RJ, Bore PJ, Chan L, Gadain DG, Styles P, Taylor P, Radda GK. Nuclear magnetic resonance studies of forearm in Duchenne dystrophy. *Br Med J* 1982, 284, 1072-1074.

Ohnishi ST, Taylor S, Gronert GA. Calcium-induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of pigs susceptible to malignant hyperthermia. *FEBS Lett* 1983, 161, 103-107.

Ohnishi ST, Waring AJ, Fang SG, Horiuchi K, Flick JL, Sadanaga KK, Ohnishi T. Abnormal membrane properties of sarcoplasmic reticulum of pigs susceptible to malignant hyperthermia : modes of action of halothane, caffeine, dantrolène and two other drugs. *Arch Biochem Biophys* 1986, 247, 294-301.

Olgin J, Argov Z, Rosenberg H, Tuchler M, Chance B. Non-invasive evaluation of malignant hyperthermia susceptibility with phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anesthesiology* 1988, 68, 507-513.

Olgin J, Rosenberg H, Allen G, Seestedt R, Chance B. A blinded comparison of noninvasive, *in vivo* phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy and the *in vitro* halothane/caffeine contracture test in the evaluation of malignant hyperthermia susceptibility. *Anesth Analg* 1991, 72, 36-47.

Ørding H. Diagnosis of susceptibility of malignant hyperthermia in man. *Br J Anaesth* 1988, 60, 287-302.

Ørding H, Foder B, Scharff O. Cytosolic free calcium concentrations in lymphocytes from malignant hyperthermia susceptible patients. *Br J Anaesth* 1990, 64, 341-345.

Otsu K, Nishida K, Kimura Y, Kuzuya T, Hori M, Kamada T, Tada M. The point mutation Arg⁶¹⁵ -> Cys in the Ca^{2+} release channel of skeletal sarcoplasmic reticulum is responsible for hypersensitivity to caffeine and halothane in malignant hyperthermia. *J Biol Chem* 1994, 269, 9413-9415.

Payen JF, Bourdon L, Mezin P, Jacquot C, Le Bas JF, Stieglitz P, Benabid AL. Susceptibility to malignant hyperthermia detected non-invasively. *Lancet* 1991, 337, 1550-1551.

Payen JF, Bosson JL, Bourdon L, Jacquot C, Le Bas JF, Stieglitz P, Benabid AL. Improved noninvasive diagnostic testing for malignant hyperthermia susceptibility from a combination of metabolites determined *in vivo* with ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Anesthesiology* 1993, 78, 848-855.

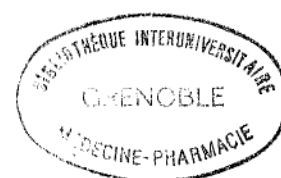
Pinder RM, Brogden RN, Speight TM et al. Dantrolene sodium : a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in spasticity. *Drugs* 1977, 13, 3-23.

Podo F, Carpinelli G, Di Vito M, Giannini M, Proietti E, Fiers W, Gresser I, Belardelli F. Nuclear magnetic resonance analysis of tumor necrosis factor-induced alterations of phospholipid metabolites and pH in Friend leukemia cell tumors and fibrosarcomas in mice. *Cancer Res* 1987, 47, 6481-6489.

Prather Strazis K, Fox AW. Malignant hyperthermia : a review of published cases. *Anesth Analg* 1993, 77, 297-304.

Rock E, Mammari MS, Vignon X, Thomas MA, Viret J. Abnormal fluidity state in membranes of malignant hyperthermia pig skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 1990, 281, 36-40.

- Rock E, Motta C, Vignon X, Kozak-Ribbens G. Fluidity state of lymphocyte plasma membrane in malignant hyperthermia susceptible pigs and humans. *Acta Anesthesiol Scand* 1993, 37, 488-492.
- Ryan JF, Lopez JR, Sanchez VB, Sréter FA, Allen PD. Myoplasmic calcium changes precede metabolic and clinical signs of porcine malignant hyperthermia. *Anesth Analg* 1994, 79, 1007-1011.
- Sato N, Fujii K, Yuge O. *In vivo* and *in vitro* sevoflurane-induced lipid peroxidation in guinea-pig liver microsomes. *Pharmacol Toxicol* 1994, 75, 366-370.
- Schaad N, Hof PR. Myorelaxants non curarisants. In : Schorderet M. *Pharmacologie*. Paris, Ed Frison Roche, 1989, 119-124.
- Scholz J, Steinfath M, Roewer N, Patten M, Troll U, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J. Biochemical changes in malignant hyperthermia susceptible swine : cyclic AMP, inositol phosphates, α_1 , β_1 - and β_2 -adrenoceptors in skeletal and cardiac muscle. *Acta Anesthesiol Scand* 1993, 37, 575-583.
- Schwander D. Anesthésiques généraux. In : Schorderet M. *Pharmacologie*. Paris, Ed Frison Roche, 1989, 303-315.
- Smith RJ. Preoperative assessment of risk factors. *Br J Anaesth* 1988, 60, 317-319.
- Sudbrak R, Procaccio V, Klausniter M, Curran JL, Monsieurs K, Van Broeckhoven C et al. *Am J Hum Genet* 1995, 56, 684-691.
- Tagaki A, Sunohara N, Ishihara T, Nonaka I, Sugita H. Malignant hyperthermia and related neuromuscular diseases : caffeine contracture of the skinned muscle fibers. *Muscle Nerve* 1983, 6, 510-514.
- Taylor P. Neuromuscular blocking agents. In : Goodman Gilman A, Goodman LS, Rall TW, Murad F. *Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics*. Pergamon Press, 8^eed, 1990, 222-235.
- Thomas DW, Dev VJ, Whitehead MJ. Malignant hyperpyrexia and isoflurane. A case report. *Br J Anaesth* 1987, 59, 1196-1198.
- Ueda I, Shinoda F, Kamaya H, Krishna PR. Malignant hyperthermia and calcium-induced heat production. *Can J Anaesth* 1994, 41, 440-445.
- Van den Bosch H. Phosphoglyceride metabolism. *Annu Rev Biochem* 1974, 43, 243-277.
- Verburg MP, Britt BA, Oerlemans FT, Scott B, van Egmond J, De Bruijn CH. Comparison of metabolites in skeletal muscle biopsies from normal humans and those susceptible to malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1986, 65, 654-657.
- Wappler F, Roewer N, Lenzen C, Köchling A, Scholz J, Steinfath M, Schulte am Esch J. High-purity ryanodine and 9,21-dehydroryanodine for *in vitro* diagnosis of malignant hyperthermia in man. *Br J Anaesth* 1994, 72, 240-242.
- Wedel DJ, Gammel SA, Milde JH, Iaizzo PA. Delayed onset of malignant hyperthermia induced by isoflurane and desflurane compared with halothane in susceptible swine. *Anesthesiology* 1993, 78, 1138-1144.



Résumé

L'hyperthermie maligne (HM) anesthésique est une myopathie infraclinique rare, génétiquement transmissible, déclenchée au cours d'une anesthésie générale par des gaz halogénés ou des curares dépolarisants. La crise d'HM est d'évolution potentiellement fatale. Le facteur déclenchant est lié à une anomalie fonctionnelle du récepteur à la ryanodine, responsable d'une brusque élévation de la concentration intracytosolique de Ca^{2+} .

Le dépistage de la sensibilité à l'HM repose actuellement sur le test de contracture *in vitro* à partir d'une biopsie chirurgicale. Méthode d'exploration non invasive du métabolisme musculaire, la Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire du phosphore 31 (SRM ^{31}P) *in vivo* a été aussi utilisée pour une évaluation dans le cadre de ce dépistage. Ainsi, une élévation d'un pic dans la région des phosphodiesteres (PDE) a été observée chez les patients HM-sensibles (HMS).

Le but de ce travail a été d'analyser l'espèce biochimique contenue dans la région des PDE sur des extraits musculaires de sujets HMS et HM-négatifs (HMN).

L'étude par SRM ^{31}P *in vitro* de 19 extraits musculaires en milieu acide a permis d'identifier la glycérophosphorylcholine (GPC) comme étant l'espèce majoritaire de la région des PDE. La concentration relative de GPC [GPC/(Pi+PCr)] a été plus élevée pour les sujets HMS ($p < 0.05$). Ces résultats obtenus *in vitro* ont été corrélés avec ceux obtenus *in vivo* ($r = 0.78$; $p < 0.005$). Aucune différence dans la proportion des fibres musculaires n'a été mise en évidence entre les groupes HMS et HMN. Ceci suggère une anomalie dans le métabolisme des phospholipides membranaires chez les sujets HMS. Nous avons essayé d'analyser par chromatographie sur couche mince et ionisation de flamme la répartition lipidique de 9 extraits musculaires. Le dosage de la lysolécithine, précurseur de la GPC, ne semble pas différent entre les groupes HMS et HMN.

L'ensemble de ces résultats serait plutôt en faveur d'une anomalie dans la voie de dégradation de la phosphorylcholine et/ou de réacylation. Cela pourrait alors argumenter la thèse d'une augmentation de la phosphorylcholine dans les muscles des sujets HMS. Par ailleurs, ces résultats *in vitro* renforcent les conclusions obtenues par SRM ^{31}P dans l'éventuel dépistage non invasif de la sensibilité à l'HM.

Mots clefs

Hyperthermie maligne, Halothane, Dantrolène, Extrait musculaire, Spectroscopie RMN ^{31}P , Phospholipides, Muscle squelettique

Jury

Monsieur le Professeur A. FAVIER
Madame I. MEYLAN
Monsieur le Professeur H. PINATEL
Monsieur le Docteur J.F. PAYEN

Date de Soutenance

11 Décembre 1995