

ACTION DU 2-PAM ET DES INHIBITEURS DE L'ACETYLCHOLINESTERASE SUR LE CHOC ANAPHYLACTIQUE DU LAPIN

J. LECOMTE et E. SCHOFFENIELS*

Institut Léon Fredericq, Physiologie et Biochimie
Université de Liège, Belgique

(Received 7 September 1960)

Abstract—DFP and eserine have certain antiallergic properties. These are not a result of blocking of the neuromuscular junctions, but of deactivation by an enzyme of an esterase character. Our results do not allow us to decide whether this enzyme is an integral part of the "complement", or a distinct molecular structure.

2-PAM (a very specific reactuator of acetylcholinesterase that has been inhibited by alcoyl-phosphates) is able to suppress the protective action of DFP. This suggests that the configuration of the active centres of the enzyme are very close to that of acetylcholinesterase. We propose to name this enzyme *anaphylesterase*.

LORSQUE dans le plasma ou le sérum d'un animal sensibilisé, les antigènes se combinent aux anticorps correspondants, le complément se fixe aux complexes ainsi formés.

Le complément est également fixé à la surface des cellules porteuses de pareils complexes. Il en résulte une modification de la perméabilité de la membrane, qui se traduit, notamment, par une diminution de la concentration intracellulaire en K et en acides aminés, et s'il s'agit des hématies, par une perte d'hémoglobine (hémolyse).¹ Ces différents effets sont donc le reflet de l'activité du complément.

Comme l'ont montré Levine² et Becker³, les inhibiteurs des estérases, en particulier les alcoyl-phosphates, atténuent *in vitro* le décours de certaines réactions immunitaires, telle l'augmentation de perméabilité, responsable de l'hémolyse des hématies sensibilisées. C'est pourquoi ces auteurs concluent que certains composants du complément sont doués de caractères propres aux estérases. D'ailleurs, les cellules sensibilisées qui ont fixé le complément ont acquis la propriété d'hydrolyser le *p*-toluénésulfonylarginineméthyl ester (TAME).³ En outre, certains constituants du complément, une fois purifiés, hydrolysent l'acétyltyrosyléthyl ester.^{4, 5}

Puisque l'une des activités enzymatiques d'origine complémentaire semble être celle d'une estérase, nous avons recherché si, d'une part, les alcoyl-phosphates sont capables *in vivo* de modifier le décours du choc anaphylactique et si, d'autre part, l'iode de N-méthylpyridine-2-aldoxime (2-PAM), réactuator spécifique de l'acétylcholinestérase inhibée par les alcoyl-phosphates,⁶ est susceptible de perturber les effets éventuels du dérivé organophosphoré. Wilson⁷ a, en effet, montré que les

* Chercheur qualifié du Fonds National de la Recherche Scientifique.

fonctions possédant un caractère nucléophilique (fonction amine, pyridyl, hydroxyl, sulfhydryl, etc.) réactivent l'acétylcholinestérase phosphorylée.

METHODES

Les lapins ont été sensibilisés 3 semaines avant l'expérience par administration sous-cutanée de 5 ml de blanc d'oeuf de poule, pendant 3 jours consécutifs.

Le jour de l'expérience, les lapins sont anesthésiés au Nembutal, par voie intraveineuse, à raison de 30 mg/kg. Après trachéotomie, la respiration artificielle est instaurée d'emblée. La pression artérielle est enregistrée à la carotide.

Les lapins, d'abord injectés par voie intraveineuse, de sulfate d'atropine à raison de 3 mg/kg, ont été ensuite répartis en trois groupes. Le premier est traité par le diisopropylfluoro phosphate de soude (DFP) injecté par voie intraveineuse à doses fractionnées jusqu'à un total de 4 mg/kg.

Le second groupe est également traité par le DFP. Lorsque les symptômes de l'intoxication sont installés depuis quelques minutes, l'animal reçoit en injection intraveineuse de l'iodure de N-méthylpyridine-2-aldoxime (2-PAM, pyridine-2-aldoxime methiodide) à raison de 75 mg/kg. Cette substance définie par Wilson, débloque de manière instantanée l'acétylcholinestérase inactivée par les alcoyl-phosphates.⁸⁻¹¹

Le troisième groupe de lapins sensibilisés est injecté de physostigmine (ésérine) à doses fractionnées, jusqu'à un total de 4 mg/kg. Dans une expérience contrôle, un lapin de ce groupe a été traité par 2-PAM après l'installation de l'intoxication ésérinée.

Quinze à vingt minutes après la dernière injection, soit de l'inhibiteur, soit du 2-PAM, l'antigène est administré sous la forme d'une solution de blanc d'oeuf dilué au quart par NaCl 0,9%, à raison de 1 ml/kg.

Les variations de la pression artérielle générale permettent de juger de l'intensité des réactions anaphylactiques. Celles-ci sont d'autant plus importantes que l'hypotension est plus profonde et plus durable.

RESULTATS

(1) L'administration de DFP, comme celle de physostigmine, entraîne par blocage de l'acétylcholinestérase et accumulation subséquente d'acétylcholine l'apparition de symptômes nombreux et divers. Les uns sont de nature muscarinique, tels la salivation, la bradycardie et le miosis ; ils sont inhibés par l'atropine. Les autres, nicotiniques, parmi lesquels la fibrillation musculaire généralisée, ne sont pas supprimés par cet alcaloïde. Cette fibrillation disparaît lorsque l'accumulation progressive d'acétylcholine a finalement bloqué les récepteurs de synapses neuromusculaires. La disparition de toute coordination neuromusculaire par ce blocage synaptique entraîne l'arrêt de la respiration.

Puisque les lapins sensibilisés dont nous étudions les réactions sont d'emblée soumis à la respiration artificielle et traités par l'atropine, ils sont donc protégés des effets immédiats, muscariniques et nicotiniques, de l'intoxication par le DFP ou par l'ésérine. L'acétylcholinestérase est évidemment inactivée.

(2) Les lapins sensibilisés intoxiqués par le DFP ou la physostigmine présentent, lors de l'administration intraveineuse de l'antigène, une chute tensionnelle peu importante, de durée brève. Les propriétés anti-anaphylactiques de l'ésérine sont plus

marquées que celle du DFP (Tableau 1). Les inhibiteurs des estérases se montrent ainsi doués d'une certaine activité anti-allergique. Celle-ci, toutefois, n'est pas suffisante pour supprimer entièrement toute manifestation tensionnelle d'origine anaphylactique, comme le montre la Fig. 1.

(3) L'administration de 2-PAM au lapin préalablement traité par l'ésérine ne modifie pas l'intoxication que provoque alors le blocage de l'acétylcholinestérase. La chute de

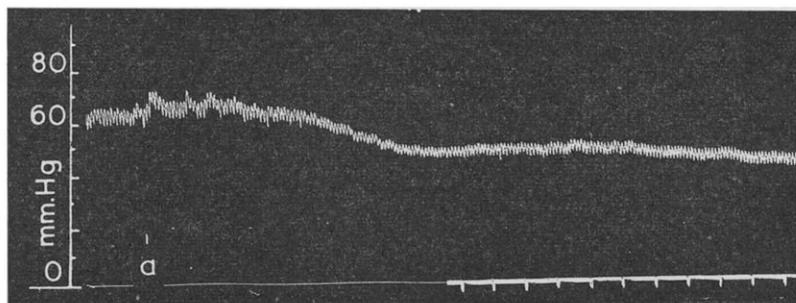


FIG. 1. Effet anti-anaphylactique de l'ésérine.

Enregistrement de la pression artérielle carotidienne d'un lapin de 2 kg 100, anesthésié au nembutal par voie intraveineuse et soumis à la respiration artificielle. Temps en minutes.

L'animal a été sensibilisé par l'administration de blanc d'oeuf, 3 semaines auparavant. Dès la fin de l'anesthésie, il a reçu 3 mg/kg d'atropine, puis de l'ésérine à raison de 4 mg/kg.

En *a* s'effectue l'administration déchaînante de blanc d'oeuf. Elle n'est suivie d'aucune chute tensionnelle immédiate: l'animal est protégé des effets de la réaction anaphylactique.

TABLEAU 1. ACTION DES INHIBITEURS DES ESTÉRASES SUR L'HYPOTENSION ANAPHYLACTIQUE

Conditions	Pression artérielle (% de la valeur -contrôle)	Durée de l'hypotension minutes	Nombre d'observations
DFP	40	12	5
DFP + PAM	10	25	4
ésérine	50	10	4

Les lapins sont sous respiration artificielle et reçoivent de l'atropine (3 mg/kg). Le DFP, l'ésérine et le 2-PAM sont injectés, en doses fractionnées, par voie intraveineuse. La pression artérielle est enregistrée à la carotide. Les chiffres du tableau expriment en % du contrôle, la valeur la plus basse obtenue lors de l'injection intraveineuse de l'antigène.

pression artérielle qui suit l'injection de l'antigène reste alors peu importante et de très courte durée. Ce résultat s'explique facilement: le 2-PAM ne réactive l'acétylcholinestérase que lorsque cet enzyme a été inhibé par un organophosphoré. Ce résultat est toutefois important, puisqu'il démontre que c'est bien au niveau d'une activité estérasique que le DFP et l'ésérine exercent leur action anti-anaphylactique.

(4) L'administration de 2-PAM aux lapins intoxiqués par le DFP entraîne immédiatement la disparition des fasciculations musculaires et restaure la force de contraction des muscles respiratoires. L'hydrolyse de l'acétylcholine est de nouveau possible. Le

blockage synaptique est aboli et la respiration artificielle peut alors être suspendue sans danger.

(5) Les lapins sensibilisés, d'abord traités par le DFP, ensuite par le 2-PAM, se trouvent, en ce qui concerne l'acétylcholinestérase, dans un état analgogue à celui des animaux qui n'auraient reçu que de l'atropine. Quand de l'antigène préparant leur est injecté par voie intraveineuse, ils présentent, après une latence de 30 à 45 sec, une chute brutale (7 cm Hg) et durable (25 min) de la pression artérielle, caractéristique du choc anaphylactique (Fig. 2). L'examen nécropsique du cœur révèle d'ailleurs la turgescence pathognomonique de l'artère pulmonaire.

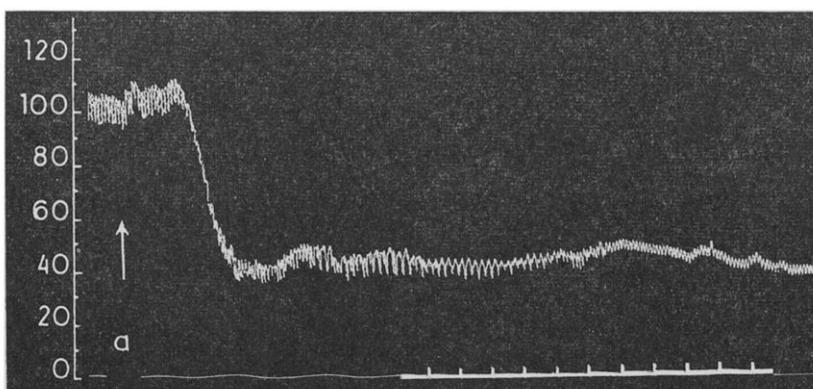


FIG. 2. Absence d'effet anti-anaphylactique du traitement DFP/2-PAM.

Enregistrement de la pression artérielle carotidienne chez un lapin sensibilisé (2 kg), anesthésié et soumis à la respiration artificielle (conditions identiques au lapin qui a servi à obtenir la Fig. 1).

Après injection d'atropine, il a reçu du DFP (4 mg/kg) jusqu'à apparition des signes d'intoxication, notamment fasciculation musculaire. A ce moment, injection intraveineuse rapide de 2-PAM (75 mg/kg) entraînant la disparition des signes toxiques.

En *a* s'effectue l'administration déchainante du blanc d'oeuf. Elle provoque alors une chute tensionnelle immédiate suivie d'un collapsus durable. L'animal n'est pas protégé.

Ce résultat est à rapprocher de l'observation de Becker¹² montrant que l'acide hydroxamique restaure, *in vitro*, l'activité du complément inhibée par le DFP, puisque, comme l'a démontré Wilson⁷, c'est par son caractère nucléophile que l'acide hydroxamique réactive l'acétylcholinestérase phosphorylée.

Quelques expériences supplémentaires effectuées à titre de contrôle nous ont montré que chez les lapins sensibilisés dont la pression artérielle a été au préalable fortement abaissée par l'administration intraveineuse de l'antigène préparant, l'injection intraveineuse d'atropine (4 mg/kg) ne provoque pas la récupération des valeurs tensionnelles normales.

L'atropine, à elle seule, s'avère ainsi incapable de modifier le déroulement du choc de sensibilisation.

DISCUSSION

(1) L'atropine administrée à doses élevées ne prévient ni ne corrige l'hypotension artérielle générale d'origine anaphylactique. Puisque cet alcaloïde entre en compétition avec l'acétylcholine ou les autres substances cholinergiques, pour les récepteurs

des fibres musculaires lisses, on peut conclure qu'au cours de la réaction antigène-anticorps, il n'y a pas de libération de corps à activité cholinergique. La nature du mécanisme responsable de l'activation anaphylactique des fibres musculaires lisses doit donc être cherchée ailleurs que dans la libération d'une substance acétylcholinomimétique. D'ailleurs, les manifestations cardiaques d'origine allergique qui accompagnent la chute de la pression artérielle ne sont pas comparables à celles qui témoignent de l'accumulation périphérique d'un corps cholinergique.¹³

(2) Bien qu'ils s'avèrent incapables de supprimer complètement la chute tensionnelle d'origine anaphylactique, le DFP et l'ésérine sont doués d'une certaine activité anti-allergique. Celle-ci, qualitativement, est beaucoup moins importante que celle des diphenylpyrazolones. Elle dépend vraisemblablement de la mise hors d'action de certains processus secondaires participant accessoirement au déclenchement du choc anaphylactique.

Les effets anti-anaphylactiques du DFP et de l'ésérine ne peuvent pas dépendre d'une action au niveau des récepteurs des jonctions neuromusculaires, puisque ces derniers ne paraissent pas être intéressés directement dans la pathogénie du choc. Ces effets ne peuvent pas davantage s'expliquer par l'inhibition de l'acétylcholinestérase au niveau des synapses.

Il est donc nécessaire de postuler que ces inhibiteurs inactivent un autre enzyme à fonction estérasique. Comme cet enzyme, lorsqu'il est inhibé par un alcoyl-phosphate, est réactivé par un antidote aussi spécifique de l'acétylcholinestérase que le 2-PAM, nous devons conclure que la configuration des centres actifs de cet enzyme doit être très voisine de celle de l'acétylcholinestérase. Cet enzyme est-il le complément ou s'agit-il d'une entité chimique distincte ? Nos résultats ne permettent pas de tirer de conclusions à ce sujet. Mais, ce qui paraît établi, c'est que l'activité d'un enzyme à fonction estérasique semble impliquée à titre accessoire dans la pathogénie du choc.

(3) Nous proposons d'appeler cet enzyme "anaphyléstérase". Cette nouvelle appellation ne fait pas double emploi avec celle de "complément", même si des travaux ultérieurs démontrent qu'"anaphyléstérase" et "complément" désignent une même structure. Le terme d'"anaphyléstérase" nous paraît, en effet, plus conforme que le terme de "complément" aux règles de la nomenclature enzymologique. De plus, il a l'avantage de définir plus précisément un des mécanismes biochimiques responsable du choc anaphylactique, à savoir: l'hydrolyse d'une liaison ester.

RESUME

Le DFP et l'ésérine sont doués de certaines propriétés anti-allergiques. Cette action n'est pas le résultat d'un blocage des jonctions neuromusculaires, mais dépend de l'inactivation d'un enzyme à caractère estérasique. Cet enzyme fait-il partie intégrante de ce qu'on appelle généralement le complément, ou s'agit-il d'une structure moléculaire distincte ? Nos résultats ne permettent pas de tirer de conclusions à ce sujet. Le fait que le 2-PAM, un réacteur très spécifique de l'acétylcholinestérase inhibée par les alcoyl-phosphates, est capable de supprimer l'action protectrice du DFP, suggère que la configuration des centres actifs de l'enzyme est très voisine de celle de l'acétylcholinestérase. C'est pourquoi nous proposons d'appeler cet enzyme l'"anaphyléstérase", dénomination conforme aux règles de la nomenclature enzymologique. Cette nouvelle appellation a également l'avantage de définir plus précisément un des

mécanismes biochimiques responsable du choc anaphylactique, à savoir: l'hydrolyse d'une liaison ester.

Remerciements—Nous remercions le Dr. D. Nachmansohn, professeur de Biochimie à la Columbia University, New-York, d'avoir bien voulu nous fournir le 2-PAM utilisé dans ces expériences.

BIBLIOGRAPHIE

1. H. GREEN et B. GOLDBERG, Abstract, *Fourth Tissue Homotransplantation Conference* Third Session. New York (1960).
2. L. LEVINE, *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 283 (1955).
3. E. L. BECKER, *J. Immunol.* **77**, 462 (1956).
4. I. LEPOW, O. RATNOFF et L. PILLEMER, *Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y.* **92**, 111 (1956).
5. I. LEPOW, O. RATNOFF, I. ROSEN et L. PILLEMER, *Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y.* **92**, 32 (1956).
6. I. B. WILSON et S. GINSBURG, *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 283 (1955).
7. I. B. WILSON, *J. Biol. Chem.* **199**, 113 (1952).
8. I. B. WILSON, *Molecular Biology* (Edited by D. NACHMANSON) p 163. Academic Press, New York (1960).
9. I. B. WILSON, *Second Conference on Physico-Chemical Mechanism of Nerve Activity* p. 81. Academic Press, New York (1959).
10. H. KEWITZ, I. B. WILSON et D. NACHMANSON, *Arch. Biochem. Biophys.* **64**, 456 (1956).
11. H. KEWITZ, *Arch. Biochem. Biophys.* **66**, 263 (1957).
12. E. L. BECKER, *Cellular and Humoral Aspects of the Hypertensive States* (Edited by LAURENCE) p. 37. Hoeber-Harper, New York (1959).
13. J. LECOMTE, *C.R. Soc. Biol., Paris*. Sous presse.