

## Etude des modifications structurales bronchiques induites par le fluorure de sodium

S. ROUATBI<sup>1</sup>,  
M. TLILI<sup>1</sup>,  
M.T. YACOUBI<sup>3</sup>,  
Z. TABKA<sup>1</sup>,  
H. GUENARD<sup>2</sup>

**Résumé :** L'asthme est une maladie fréquente dont la morbidité et la mortalité sont en augmentation progressive malgré les progrès réalisés dans le traitement de cette maladie. Ainsi la recherche de nouveaux moyens thérapeutiques paraît nécessaire. Il a été prouvé que le fluorure de sodium (NaF) a une action bronchorelaxante. Toutefois, aucune étude structurale n'a été entretenue dans ce sens. L'objectif de ce travail est d'identifier les modifications structurales bronchiques dues à l'inhalation de NaF 0,5 M chez le rat et ce en illustrant les modifications structurales bronchiques.

**Matériel et méthode :** L'étude a été faite sur trois groupes de rats de souche Wistar et de poids moyen  $230 \pm 30$  g. Ils ont été préalablement anesthésiés par la kétamine à raison de 150mg/Kg. Ils ont reçu par voie inhalée respectivement l'acéthylmethylcholine (ACMCH), le NaF 0,5 M et une solution saline. Une étude histologique des bronches avant et après l'administration des différents produits a été réalisée.

**Résultats :** Le NaF 0,5 M a entraîné des modifications structurales au niveau bronchique : une relaxation de la cellule musculaire lisse bronchique et vasculaire et diminution de la sécrétion du mucus par les glandes bronchiques lorsqu'il est comparé au groupe ayant reçu l'ACMCH. Ceci est en faveur de l'effet bronchodilatateur du NaF.

**Conclusion :** le NaF 0,5 M, par son action métabolique, pourrait être utile dans la réduction du bronchospasme.

**Mots clés :** asthme, muscle lisse, fluorure de sodium, hyperréactivité bronchique

**Abstract :** Asthma is a chronic inflammatory disease of the lung. Its morbidity and mortality are in progressive increase despite progress done on the management of this disease. New therapeutic tools should be established. It has been proved that sodium fluoride (NaF) had a bronchorelaxant action. Therefore, there are no structural studies proving this action. So, the purpose of this study is to illustrate structural bronchial modifications after the inhalation of NaF at 0,5 M in rats.

**Methods :** Three groups of male Wistar rats with medium weight of  $230 \pm 30$  g inhaled respectively acethylmetylcholine (ACMCH), NaF at 0,5 M and saline solution. Rats were anesthetized by Ketamine 150 mg/Kg. Bronchial structural changes were studied on rats after having been sacrificed.

**Results :** NaF 0,5 M have led to structural changes on bronchi : modification of the thickness of the muscular layer and changes of peribronchial vessels. Compared to group of ACMCH, NaF 0,5 M led to a reduction of mucine on the bronchial lumen.

**Conclusion :** NaF 0,5M, by its metabolic action, can be used as a treatment of the bronchial spasm.

**Key words :** Asthma, Bronchial hyperresponsiveness, sodium fluoride, smooth muscle

<sup>1</sup>. Laboratoire de Physiologie,  
Faculté de Médecine Ibn El  
Jazzar, Sousse.

<sup>2</sup>. Laboratoire de Physiologie,  
Faculté de Médecine,  
Bordeaux 2.

<sup>3</sup>. Laboratoire d'anatomie  
pathologique, CHU Farhat  
Hached, Sousse.

### Introduction

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes caractérisée par une hyperréactivité de celles-ci à divers stimuli qui entraînent une obstruction bronchique paroxystique responsable de symptômes variables, réversibles spontanément ou sous l'effet des traitements [1, 2, 3, 4]. Elle est caractérisée par d'importantes variations des résistances à l'écoulement de l'air sur des courtes périodes de temps et liées à la contraction du muscle lisse bronchique d'une part, et à l'accumulation de mucus d'autre part [5]. L'hyper-réactivité bronchique est une des caractéristiques principales de cette maladie. Elle est définie comme étant une réponse exagérée des bronches et plus précisément du muscle lisse bronchique à différentes stimulations pharmacologiques (histamine, métacholine) et physiques (air froid et sec) [6]. La mise en place d'un traitement de cette maladie doit être fondé sur une bonne analyse physiopathologique et une bonne évaluation des différents facteurs étiologiques [3]. Les moyens thérapeutiques disponibles pour le traitement de l'asthme sont nombreux. Ils consistent à réduire la contraction du muscle lisse bronchique par leurs actions antagonistes membranaires (les  $\alpha_2$ -sympathomimétiques, les anti-cholinergiques). Malgré l'efficacité de ces traitements, le nombre d'asthmatiques croît et la mortalité ne diminue pas suffisamment [1]. L'asthme aigu grave est une crise grave qui résiste au traitement habituel des crises [7]. Aucun de ces médicaments habituels de l'asthme ne s'attaque directement au métabolisme énergétique de la cellule musculaire lisse. Ces constatations nous ont poussé à tester l'action d'une nouvelle molécule, le fluorure de sodium (NaF), au niveau bronchique. En effet, le NaF a été utilisé dans le traitement préventif de la carie dentaire et le traitement de l'ostéoporose avec tassements vertébraux [8]. Il a été démontré, *in vitro*, qu'il intervient dans le contrôle de la contraction de la cellule musculaire lisse en inhibant certaines enzymes de la glycolyse [9]. Ainsi, les objectifs de ce travail sont d'illustrer d'une part les modifications histologiques induites par le NaF au niveau des voies aériennes et d'expliquer son mécanisme d'action au niveau bronchique d'autre part.

### Matériel et méthodes

Trois groupes de rats de souche Wistar, de sexe masculin et de poids moyen  $230 \pm 30$  g ont été utilisés. Le premier groupe de rats ( $n = 8$ ) a reçu une solution saline par voie inhalée (groupe témoin). Le deuxième groupe ( $n = 12$ ) a reçu, par voie inhalée, l'acétyl méthyl choline (ACMCH) seule à des concentrations croissantes allant de 1,25 à 68 mg/l. Le troisième groupe ( $n = 8$ ) a inhalé du NaF 0,5 M à partir de la quatrième dose d'ACMCH tout en maintenant l'exposition à l'ACMCH.

Dans les différents protocoles, les rats ont été anesthésiés par voies intra péritonéale par la Kétamine, à la concentration de 150 mg/Kg. Des nébuliseurs DeVilbiss (Réf 123016 Marquette Medical products, Englewood co. USA) ont été utilisés pour faire inhaler aux rats les différents produits testés pendant 7 minutes. Le rat a été fixé sur une planche et mis sous une cloche servant de chambre d'inhalation. Celle-ci a été reliée par un tube au nébuliseur. Une pompe est connectée au nébuliseur permettant un débit d'air fixe à 10 l/min. Ils ont été ensuite sacrifiés par l'injection du chlorure de potassium (KCl) en intracardiaque direct. Une dissection et un prélèvement des poumons ont été effectués par un médecin spécialiste pour faire un examen anatomo-pathologique. Sur le poumon prélevé, des coupes sériées sagittales allant du hile vers le parenchyme périphérique ont été réalisées. Les mêmes niveaux de coupes ont été reproduits pour chaque groupe. Les fragments coupés ont été mis dans des caissettes. Ensuite, ils ont été fixés dans du formol à 15% pendant 24 heures. Une déshydratation des fragments a été ensuite effectuée. Elle a duré 18 heures et a été réalisée au moyen d'une histokinette permettant de laisser les caissettes dans différents bains pendant une période de temps déjà fixée : Un bain de formol 95% pendant 90 minutes. Trois bains dans l'alcool 95%, le premier durant 2 heures 45 minutes, le deuxième 1 heure 15 minutes et le troisième 2 heures. Trois bains dans le toluène, le premier durant 2 heures, le deuxième 1 heure 45 minutes et le troisième 2 heures. Enfin, deux bains de paraffine à 60°, le premier durant 2 heures et le deuxième de 3 heures. Des coupes fines de 5  $\mu$ m d'épaisseur sur le bloc de paraffine ont été réali-

sées. Après l'hydratation de ces coupes, elles ont été mises dans 3 bains d'alcool respectivement à 95% pendant 10 minutes, 70% et 50%. Finalement, la lame a été rincée à l'eau courante de robinet pendant 5 à 10 minutes pour éliminer tout fixateur en excès. La coloration des noyaux a été réalisée par l'hématoxyline et leur différenciation a été effectuée au moyen d'un rinçage durant quelques secondes par l'alcool acidifié à 70% suivi d'un autre rinçage à l'eau de robinet pour éliminer l'excès d'acide. Pour la coloration du cytoplasme, un bain d'éosine durant 5 minutes a été effectué suivi d'un rinçage à l'eau de robinet pendant 2 à 3 minutes. La lecture a nécessité des colorations histo-chimiques de type Trichrome de Masson qui colorent en vert les fibres de collagène et en rouge le muscle lisse. Les mêmes niveaux de coupe ont été observés et interprétés de façon comparative par le même médecin pathologiste. Les paramètres étudiés étaient :

- La motilité bronchique qui a été jugée sur des critères semi quantitatifs : une bronche contractée a un aspect en pseudo frange du revêtement respiratoire, alors qu'une bronche relâchée présente un revêtement assez aplati et peu festonné. L'épaisseur du muscle lisse bronchique. En effet les cellules musculaires en contraction deviennent globuleuses entraînant une augmentation visible de

l'épaisseur du muscle.

- Modification des vaisseaux péri bronchiques : diminution du diamètre vasculaire et augmentation de leur épaisseur.
- L'abondance du mucus au niveau de la lumière bronchique témoin indirect de la contraction des glandes bronchiques.

### Résultats

Les coupes réalisées au niveau des poumons des rats du groupe contrôle ont révélé un aspect normal des bronches. En effet, la lumière des bronches était béante, le mucus, à son niveau, n'était pas très abondant et la couche musculaire n'était pas très épaisse. Le muscle lisse bronchique était de forme allongée. Les vaisseaux bronchiques avaient un diamètre et une épaisseur normaux (Figure 1).

Chez le deuxième groupe de rats ayant inhalé les doses croissantes d'ACMCH, une réduction de la lumière des bronches comparée à celle du premier groupe a été notée avec la présence de mucus (M) abondant à son niveau. Un épaissement de la couche musculaire lisse a été également noté indiquant la contraction des cellules musculaires lisses qui se sont raccourcies et ont pris une forme globulaire. La lumière vasculaire bronchique a été réduite

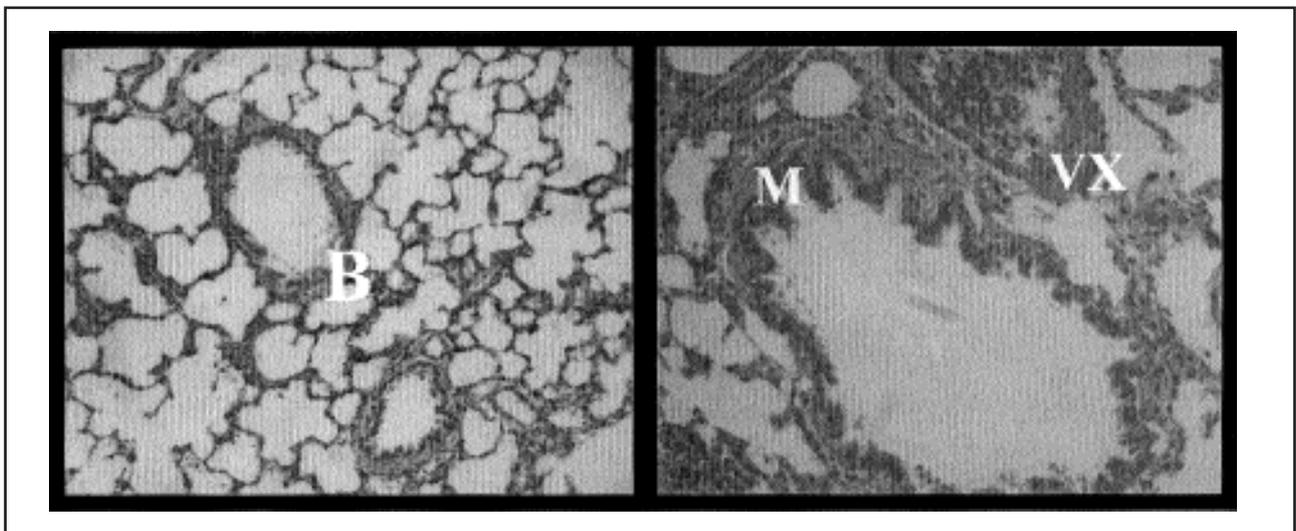


Figure.1. Aspect histologiques des bronches du groupe control.

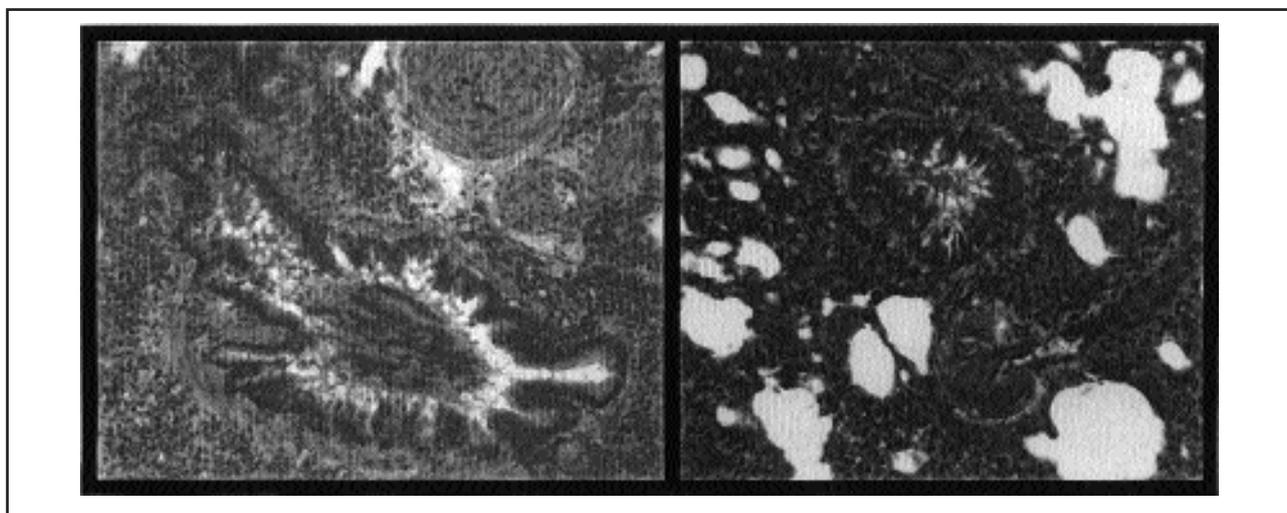
HEX200 : Lumière bronchique béante dépourvue de mucus. Muscle lisse bronchique d'aspect allongé.

témoignant d'une vasoconstriction associée à la bronchoconstriction (Figure 2).

La lumière des bronches du groupe de rats ayant pris le NaF 0,5 M par voie inhalée, a été assez béante comparativement aux bronches du groupe ayant reçu l'ACMCH seule. En effet, il existe une augmentation visible du calibre bronchique observée sur les bronches segmentaires. Comparé au groupe avec ACMCH seule, le mucus n'était pas très abondant et la contraction musculaire n'était pas maintenue (Figure 3). En effet, les

conservation de la ventilation et ses doses létales très élevées chez l'animal [10, 11, 12].

Le choix de l'ACMCH comme agent bronchoconstricteur dans cette étude revient au fait qu'il est plus stable que les autres produits pharmacologiques (Histamine, Carbachol). En effet, l'ACMCH est un agoniste muscarinique de synthèse, qui agit sur son récepteur spécifique muscarinique de sous type M3 au niveau de la cellule musculaire lisse entraînant ainsi sa contraction [2, 13, 14]. Cette contraction du muscle lisse bronchique est



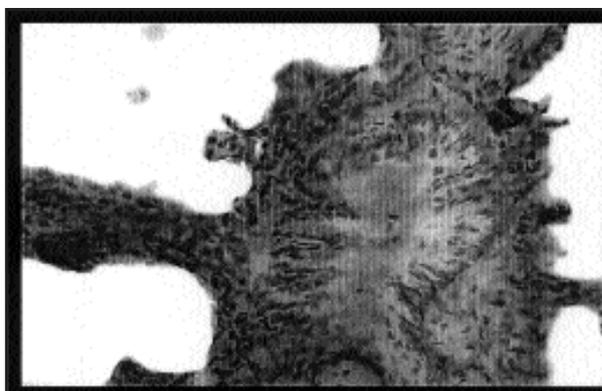
**Figure.2. Modifications structurales secondaires à l'inhalation d'ACMCH.**  
HE x 200 : Lumière bronchique réduite contenant du mucus abondant. Muscle lisse (ML) d'aspect globuleux.  
Réduction de la lumière des vaisseaux bronchiques (Vx).

cellules musculaires lisses ont repris leur forme allongée réduisant ainsi l'épaisseur de la paroi bronchique.

### Discussion

Les principaux résultats de ce travail sont : **1-** l'ACMCH a induit une contraction du muscle lisse bronchique avec une hypersécrétion glandulaire bronchique responsable d'une accumulation de mucus et une vasoconstriction des vaisseaux bronchiques. **2-** le NaF a réduit la contraction du muscle lisse bronchique et vasculaire et la sécrétion du mucus maintenant un calibre normal de la lumière bronchique.

L'anesthésie des rats par la Kétamine a été basé sur son mode d'administration facile, sa faible toxicité, sa bonne



**Figure 3. Modifications structurales dues au NaF.**  
HE x 200: lumière bronchique assez béante renfermant du mucus peu abondant. Muscle lisse d'aspect allongé.

considérée comme étant la base de l'hyperactivité bronchique qui caractérise l'asthme [6]. Toutefois, il existe peu de données qui relient les changements structuraux et fonctionnels chez les sujets asthmatiques. Dans la présente étude, l'ACMCH a induit une modification de la forme du muscle lisse bronchique, de l'allongée à la globulaire. Ceci est en accord avec les résultats de la première étude de la structure du muscle lisse bronchique des asthmatiques faite en 1922 par Huber et Koessler [in15]. Ils ont trouvé que l'hyperréactivité bronchique est associée à une augmentation de l'épaisseur du muscle lisse bronchique [15]. En plus de la bronchoconstriction, l'ACMCH a entraîné une hypersécrétion de mucus. Ceci est secondaire à la stimulation des cellules myoépithéliales des glandes bronchiques [16, 17, 18]. Une vasoconstriction avec une obstruction quasi totale de la lumière des vaisseaux bronchiques a été également notée. Le mécanisme de la vasoconstriction est en rapport avec l'action de l'ACMCH sur son récepteur spécifique au niveau du muscle lisse vasculaire [13,14]. Ainsi l'ACMCH a induit une bronchoconstriction, une hypersécrétion glandulaire avec une vasoconstriction par contraction du muscle lisse suite à l'interaction des filament d'actine et de myosine phosphorylée [19, 20].

Le choix du NaF à la concentration de 0,5 M a été basé sur les résultats des travaux de Zhao et al. (2002) qui ont démontré que ce n'est qu'à cette concentration que le NaF est capable d'induire une chute significative des résistances bronchiques [21].

Suite à l'inhalation du NaF 0,5 M, la lumière des bronches est devenue assez béante par rapport à celle observée après administration de la métacholine malgré que l'administration de l'agent bronchoconstricteur ait été poursuivie. On peut dire que la bronche a relativement retrouvé sa structure initiale en la comparant au groupe control. Ce résultat confirme l'action bronchorelaxante du NaF 0,5 M.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la réponse au fluorure : l'espèce animale, la forme chimique, la dose et la voie d'administration du produit [22]. Dans ce travail, le fluorure, a été donné aux rats par voie inhalée, sous forme de NaF et à la concentration de 0,5 M conformé-

ment aux travaux de Zhao et al. [23]. Lorsqu'il a été donné sous forme de fluorure d'aluminium (AlF), le fluorure avait une action bronchoconstrictrice[24]. L'action myorelaxante du NaF résulte de son action métabolique. En effet, le NaF est un inhibiteur du métabolisme énergétique de la cellule musculaire lisse par son action inhibitrice de l'énolase, enzyme de la glycolyse convertissant le 2-phosphoglycérate en phosphoenolpyruvate. Ainsi, la production d'ATP nécessaire à la contraction est réduite [22, 23, 25]. Le NaF a induit la relaxation du muscle lisse non seulement au niveau bronchique mais aussi au niveau vasculaire et glandulaire réduisant ainsi la production de mucus et améliorant la conductance des voies aériennes.

Les résultats de cette étude révèlent que l'inhalation du NaF 0,5 M a un effet bronchorelaxant secondaire à son action métabolique au niveau de la cellule musculaire lisse bronchique. Ainsi, il peut être proposé comme un outil pharmacologique utile pour le traitement de certaines formes d'asthme. Il s'agit d'une étude semi-quantitative qui doit être complétée par une étude morphométrique plus détaillée.

## Références

1. Bousquet J., Neukirch F., Michel FB., Godard P. Asthme: définition, épidémiologie, étiologie . EMC, Pneumologie 1996;6-039-A-20: 8.
2. Caubel A., Roche N., Huchon G. Traitement de l'asthme. EMC, Pneumologie 2002; 6-039-A-60 : 12 .
3. Sugita M., Kuribayashi K., Nakagomi T., Miyata S., Matsuyama T., Kitda O. Allergic bronchial asthma : airway inflammation and hyperresponsiveness. Intern Med 2003 Aug ; 42
4. Maddox L., Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. Annu Rev Med 2002; 53 : 447-498 (8) : 636-643.
5. Mazzarella G., Stewardi L., Grazzini M., Scano G. Mechanisms involved in airway obstruction : The role of smooth muscle. Allergy 2000 ; 55 suppl 61 : 46-48.
6. Sugita M., Kuribayashi K., Nakagomi T., Miyata S., Matsuyama T., Kitda O. Allergic bronchial asthma : airway inflammation and hyperresponsiveness. Intern Med 2003Aug ; 42 (8) : 636-643.

7. Pinto Pereira LM., Orett FA., Balbirsingh M. Physiological perspectives of therapy in bronchial hyper reactivity. *Can J Anaesth* 1996 Jul ; 43 (7) : 700-713.
8. Charles YCP., Khasayar S., Josephe Z., Carol P. Roy P., Kenneth J. Safe and effective treatment of osteoporosis with intermittent slow release sodium fluoride : Augmentation of vertebral bone and inhibition of fractures. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989 ; 68 : 150-159.
9. Giertsen E., Scheie AA. Effects of mouthrines with chlo rexidine and zinc ions combined with fluoride on the viability and glycolytic activity of dental plaque. *Eur J Oral Sci*, 1995; 103 (5) : 306-312.
10. Bremerich DH. Anesthesia in bronchial asthma. *Anesthesiol Intensivmed Not fallmed Schermerzther* 2000 Sep; 35 (9) : 545-558.
11. Martin P., Auboyer C., Molliex S. Bronchospasme préopératoire. Conférences d'actualisation 2000. Editions scientifiques et médicales Elsevier : 259-277.
12. Brown RH., Wagner EM. Mechanisms of bronchoprotection by anesthetics induction agents. Propofol versus Ketamine. *Anesthesiology* 1999 ; 90 : 822-828.
13. Strek PJ. Tests de provocation normalisés chez l'adulte : Stimulus pharmacologique, physique et sensibilisant. *Rev Mal Respir* 2001 ; 18 : 67-113.
14. Waked M., Salameh P., Attoue R., Khoury N., Bahous J. Metacholine challenge test : correlation with symptoms and atopy. *J Med Liban* 2003 Jun ; 51(2) : 74-79.
15. Chun YS., Robert S., Peter DP. Structural and functional changes in the airway smooth muscle of asthmatic subjects. *AM Respir Crit Care Med* 1998 ; 158 (5) : S 179-S 186.
16. Chitano P., Marphy TM. Maturation changes in airway smooth muscle shortening and relaxation, implications for asthma. *Respir Physiol Neurobiol* 2003 Sep 16 ; 137 (2-3) : 347-359.
17. Sparrow MP., Lamb JP. Ontogeny of airway smooth muscle : structure, innervation, myogenesis and function in the fetal lung. *Respir Physiol Neurobiol* 2003 Sep 16 ; 137 (2-3) : 361-372.
18. Kuo KH., Herrera AM., Seow CY. Ultrastructure of air way smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 137: 197-208.
19. Herrera AM., Kuo KH., Seor CY. Influence of calcim on myosine thick filament formation in intact airway smooth muscle. *Am J Physiol Cell* 2002 Feb; 282 (2): 310-316.
20. Gunst SI., Tang DD. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2000 Mar ; 15 (3) : 600-616.
21. Zhao W., Rouatbi S., Tabka Z., Guénard H. Inhaled sodium fluoride decreases airway responsiveness to acetylcholine analogs in vivo. *Respir Neurobiol* 2002; 131(3): 245-53
22. Gary MW. The metabolism and toxicity of fluoride. 2nd revised edition, Karger 1996.
23. Zhao W., Guenard H. The inhibitory effect of carbachol-induced bovine bronchial contraction. *Respir Physiol* 1997 May; 108 (2) : 171-179.
24. Ratz PH and Blackmore PF. Differential activation of rabbit femoral arteries by aluminium fluoride and sodium fluoride. *J Pharmacol Exp Therap* 1990, 254, 514-520
25. Murphy AJ., Hoover JC. Inhibition of the Na, K-ATPase by fluoride parallels with its inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *J Biol Chem* 1992 ; 267 (24) : 16695-16700.