



HAL
open science

Effet de la L-Arginine et du nitroprussiate de sodium sur la contractilité utérine : étude in vitro sur myomètre humain non gravide

Pascale Hoffmann

► **To cite this version:**

Pascale Hoffmann. Effet de la L-Arginine et du nitroprussiate de sodium sur la contractilité utérine : étude in vitro sur myomètre humain non gravide. Médecine humaine et pathologie. 1999. dumas-01468556

HAL Id: dumas-01468556

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01468556v1>

Submitted on 15 Feb 2017

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>

B.U.M. GRENOBLE
D 115 039618 9

1^{er} exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année 1999

N° D'ORDRE 5060

**EFFET DE LA L-ARGININE ET DU NITROPRUSSATE
DE SODIUM SUR LA CONTRACTILITE UTERINE**
Etude in vitro sur myomètre humain non gravide

THESE

**PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT**

Pascale HOFFMANN
[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le 15 octobre 1999 à 17 heures

Devant le jury composé de

Monsieur le Professeur J.C PONS
Monsieur le Professeur C RACINET
Monsieur le Professeur G BESSARD
Monsieur le Docteur J.M AYOUBI
Madame le Docteur F STANKE

PRESIDENT DU JURY

Erratum

P 6 : 4^{ème} paragraphe, supprimer l'accent sur « à commencé ».

P12 : dernier paragraphe, 2^{ème} ligne, lire (22) au lieu de (V.REF 50).

P 24 : premier paragraaphe, 4^{ème} ligne, supprimer le « s » à « tels ».

P 27 : figure 6, lire (d'après J.L.Freslon dans pharmacologie moléculaire, année 1989).

P 32 : ligne 4, lire « une synthèse de tout » au lieu de « tous ».

P 34 : 4^{ème} paragraphe, ligne 2, lire (40) au lieu de (V.Ref 50 jcp).

P 36 : 3^{ème} paragraphe, ligne 2, lire (46) et (55) au lieu de (FS 2)et (V.Ref 70 JCP).

P 46 : 2^{ème} paragraphe, 2^{ème} ligne, lire (35,50,72,73,75) au lieu de (V.REF 30,33,34,35,36) et 3^{ème} paragraphe, 3^{ème} ligne, lire (35) eu lieu de (V.REF 35).

P 66 : 2^{ème} paragraphe, 1^{ère} ligne, lire « figure 16 » au lieu de « figure 13 ».



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté
 Vice-Doyen
 Assesseurs

M. le Professeur J. L. DEBRU
 M. le Professeur A. HADJIAN
 M. le Professeur B. RAPHAEL
 M. le Professeur J.P. ROMANET
 M. le Professeur B. SELE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AMBLARD	Pierre	Dermato. Vénérologie	HOMMEL	Marc	Neurologie.
AMBROISE-THOMAS	Pierre	Parasitologie et Mycol.	HOSTEIN	Jean	Hépto-Gastro-Entérol.
BACONNIER	Pierre	Biostatistiques et Informatique Méd.	JUVIN	Robert	Rhumatologie
BACHELOT	Ivan	Endocrinologie et Maladies Métaboliques	JOUK	Pierre-Simon	Biologie du Dévelop.. et de la reproduction.
BARGE	Michel	Neurochirurgie	LAVIEILLE	Jean-Pierre	O.R.L.
BARRET	Luc	Médecine Légale	LE BAS	François	Biophys.et Trait. de l'Image.
BAUDAIN	Philippe	Radiologie et Imag. Méd.	LEBEAU	Jacques	Stomat. et Chirurgie Maxillo-Faciale
BEANI	J.-Claude	Dermatologie,Vénérologie	LEROUX	Dominique	Génétique
BENABID	Al.-Louis	Biophys. et Trait. de l'image	LETOUBLON	Christian	Chirurgie Générale
BENSA	J. Claude	Immunologie	LEVERVE	Xavier	Thérapeutique
BERNARD	Pierre	Gynéco et Obstétrique	LEVY	Patrick	Physiologie
BESSARD	Germain	Pharma. Fondamentale	LUNARDI	Joël	Biochimie et Bio. Molécu.
BLIN	Dominique	Chir. Thor.et Cardio Vascul.	MACHECOURT	Jacques	Cardio. et Maladie Vascul.
BOLLA	Michel	Radiothérapie	MAGNE	Jean-Luc	Chir. Vasculaire
BOST	Michel	Pédiatrie	MALLION	J. Michel	Méd.du Trav. et Risques Prof.
BOUGEROL	Thierry	Psychiatrie d'adultes	MASSOT	Christian	Médecine Interne
BOUCHARLAT	Jacques	Pédo Psychiatrie	MERLOZ	Philippe	Chir. Ortho. et Traumatol.
BRAMBILLA	Christian	Pneumologie	MOREL	Françoise	Bioch. et Biol. Moléculaire
BRAMBILLA	Elisabeth	Anatomie et Cyto. Pathol.	MICOUD	Max	Maladies Infect. et Trop.
BRICHON	P.Yves	Chir. Thor. et Cardio.Vasc.	MOUILLON	Michel	Ophthalmologie
CARPENTIER	Françoise	Thérapeutique	MOUSSEAU	Mireille	Cancérologie
CARPENTIER	Patrick	Méd.Interne	MOUTET	François	Chir. Plast.Reconst. et Esth.
CESBRON	Jean-Yves	Immunologie	PASQUIER	Basile	Anat. et Cyto.Patho
CHAMBAZ	Edmond	Biologie Cellulaire	PASSAGIA	J.-Guy	Anatomie.
CHARACHON	Robert	O.R.L.	PAYEN de LA		
CHIROSSEL	J. Paul	Anatomie	GARANDERIE	J. François	Anesthésiologie
CINQUIN	Philippe	Biostatistique et Inf. Méd.	PELLAT	Jacques	Neurologie
COLOMB	Maurice	Immunologie	PHELIP	Xavier	Rhumatologie
CORDONNIER	Daniel	Néphrologie	PISON	Christophe	Pneumologie
COULOMB	Max	Radiologie et Imagerie Méd.	POLACK	Benoît	Hématologie
CROUZET	Guy	Radiologie et Imagerie Méd.	POLLAK	Pierre	Neurologie
DEBRU	Jean-Luc	Médecine Interne	PONS	Jean-Claude	Gynécologie et Obstétrique
DE GAUDEMARIS	Régis	Méd. du Trav. et des risques professionnels.	RAMBAUD	Pierre	Pédiatrie
DEMONGEOT	Jacques	Biostatistique et Inf. Méd	RAMBEAUD	J. Jacques	Urologie
DESCOTES	Jean-Luc	Urologie	RAPHAEL	Bernard	Stomato. et Chirurgie Maxillo-faciale
DUPRE	Alain	Chirurgie Générale	REYT	Emile	O.R.L.
DYON	J.François	Chirurgie Infantile	ROMANET	J. Paul	Ophthalmologie
FAGRET	Daniel	Bioph et Trait. Image	SARAGAGLIA	Dominique	Chir. Orthopédique et Traumatologique
FAURE	Claude	Anatomie	SCHAERER	René	Cancérologie
FAVROT	Marie C.	Cancerologie CLB Lyon	SEIGNEURIN	Daniel	Histo.embryo.cytogénét. Reproduction
FEUERSTEIN	Claude	Physiologie	SEIGNEURIN	J. Marie	Bactério-Viro - Hygiène.
FOURNET	Jacques	Hépto-Gastro-Entéro.	SELE	Bernard	Biologie du Développement et de la Reproduction
FRANCO	Alain	Médecine. Interne	SOTTO	J. Jacques	Hématologie et Transfusion
FRANCOIS	Patrice	Épidém., Écon. de la Sant. et Prévention.	STAHL	J. Paul	Maladies Infect. et Trop.
GARNIER	Philippe	Pédiatrie	VANZETTO	Gérald	Clin./Urgences Cardio.
GIRARDET	Pierre	Anesthé. et Réa. Chir.	VIALTEL	Paul	Néphrologie
GOULLIER	Andrée	Parasitologie et Mycologie	VUILLEZ	J.-Philippe	Biophys./Méd. Nucléaire
GUIDICELLI	Henri	Chirurgie Vasculaire	VROUSOS	Constantin	Radiothérapie
GUIGNIER	Michel	Réanimation Médicale	ZARSKI	J.Pierre	Hépto-Gastro-Entérol.
HADJIAN	A.-Jean	Biochimie et biol.Mol			
HALIMI	Serge	Nutrition			

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE**

Année 1999

N° D'ORDRE

**EFFET DE LA L-ARGININE ET DU NITROPRUSSATE
DE SODIUM SUR LA CONTRACTILITE UTERINE**
Etude in vitro sur myomètre humain non gravide

THESE

**PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT**

Pascale HOFFMANN

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le 15 octobre 1999 à 17 heures

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur J.C PONS

PRESIDENT DU JURY

Monsieur le Professeur C RACINET

Monsieur le Professeur G BESSARD

Monsieur le Docteur J.M AYOUBI

Madame le Docteur F STANKE

**Il cherchait la fameuse machine à peser les balances...
PREVERT**

A Ana et Kosta,
« *maman el'travail* »

A leur père mon amour,

A mes parents et mes amis,

Merci.

A monsieur le Professeur PONS

Vous me faites l'honneur de présider ce jury.

Pour votre écoute et vos conseils,

Soyez remercié.

A monsieur le professeur RACINET

Vous me faites l'honneur et l'immense plaisir d'être membre de ce jury.

Pour avoir su cultiver en moi l'amour de l'obstétrique, guider mes choix et,

par votre exemple, ouvrir mon esprit à la recherche,

pour votre rigueur, votre aide et vos précieux conseils,

soyez assuré de mon respect profond et fidèle.

A monsieur le professeur BESSARD

Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail,

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

A monsieur le Docteur AYOUBI,

C'est par lui que ce travail à commencé,

Il m'a fermement encouragée pendant les temps difficiles

de mise au point et de rédaction,

qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Merci Jean-Marc.

A madame le Docteur STANKE,

Sans elle ce travail ne serait resté qu'un projet.

Elle a su m'aider à découvrir les rudiments de la physiologie musculaire lisse, et des expérimentations *in vitro*.

Sa disponibilité, sa gentillesse, sa patience et son écoute

Sont inégalables, son sourire inoubliable.

Merci Françoise.

A madame CARON,

Vous m'avez tout appris,

A tenir une pipette, à faire des dilutions, à organiser mes " manip' "

Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements.

Aux chirurgiens qui " opèrent les dames ", sans qui ce travail n'aurait pas pu être fait,

Merci.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES	10
CHAPITRE 1 : LA CONTRACTION UTÉRINE	14
I : PHYSIOLOGIE DE LA CONTRACTION UTÉRINE	15
I.1 : ANATOMIE ET STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UTÉRUS	15
I.2 : STRUCTURE ET ULTRASTRUCTURE DE LA FIBRE MYOMÉTRIALE	17
I.3 : L'APPAREIL CONTRACTILE	19
I.3.1 : LES FILAMENTS FINS	19
I.3.2 : LES FILAMENTS ÉPAIS	20
I.3.3 : LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES	21
I.3.4 : LES CORPS DENSES	22
I.4 : LA CONTRACTION UTERINE	22
I.4.1 : ACTIVITÉ ÉLECTRIQUE	22
I.4.2 : LES JONCTIONS GAP	23
I.4.3 : INTERACTION DES PROTÉINES CONTRACTILES	24
I.4.4 : RÉGULATION DE LA CONCENTRATION DU CALCIUM LIBRE INTRACELLULAIRE	29
I.4.5 : LES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES ET LES SECONDS MESSAGERS	30
I.4.6 : RÉCAPITULATIF DES DIFFÉRENTS INTERVENANTS DANS LA CONTRACTION DE LA FIBRE MUSCULAIRE UTÉRINE	32
CHAPITRE 2 : LE MONOXYDE D'AZOTE	33
I : PRÉSENTATION DU GAZ	34
II : DÉTECTION DU NO ET DOSAGE	35
III : SYNTHÈSE DU NO	36
IV : LES NO-SYNTASES	37
V : MODE D'ACTION ET EFFET DU NO	40
VI : INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DE NO	42
VII : APPORT EXOGENE DE NO	43
VII.1 : A PARTIR DES DÉRIVÉS NITRÉS	43
VII.2 : A PARTIR DES DERIVES DES SYDNONIMINES	43
VIII : ACTION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE	44
CHAPITRE 3 : UTÉRUS ET NO	45
I : Y A-T-IL DES NOSYNTASES DANS L'UTÉRUS ?	46
II : LE NO JOUE-T-IL UN RÔLE DANS L'UTÉRUS ?	46
II.1 : RÔLE DU NO DANS LE CYCLE	47

II.2 : RÔLE DU NO EN PHASE PRÉIMPLANTATOIRE	47
II.3 : NO ET PRÉÉCLAMPSIE	48
II.4 : RÔLE DU NO DANS LA GROSSESSE NORMALE	49
CHAPITRE 4 : PARTIE EXPERIMENTALE	51
I : OBJECTIFS	52
II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	53
II.1 : ORIGINE DES PRÉLÈVEMENTS	53
II.2 : PRÉPARATION DES TISSUS	54
II.3 : DESCRIPTION DES CUVES À ORGANE ISOLÉ	55
II.4 : MISE EN TENSION DES BANDELETTES D'UTERUS	56
III : PROTOCOLE	57
III.1 : COURBE CONCENTRATION/RÉPONSE À LA L-ARGININE AVEC OU SANS BLEU DE MÉTHYLÈNE	57
III.2 : COURBE CONCENTRATION/RÉPONSE AU SNP AVEC OU SANS BLEU DE MÉTHYLÈNE	58
III.3 : ETUDE DE L'EFFET DU 8-BROMO-GMPC	58
III.4 : CRITÈRES DE JUGEMENT	58
III.5 : EXPRESSION DES RÉSULTATS ET ANALYSE STATISTIQUE	58
III.6 : PRODUITS ET RÉACTIFS	59
IV : RESULTATS GENERAUX	60
IV.1 : DESCRIPTION DE LA POPULATION	60
IV.2 : DESCRIPTION DES BANDELETTES	60
IV.3 : ETUDE DES VARIATIONS DE LA CONTRACTILITÉ UTÉRINE EN FONCTION DU TEMPS	61
IV.4 : COMPARAISON DE LA CONTRACTILITÉ DES BANDELETTES UTERINES AVANT ET APRÈS APPLICATION DE BLEU DE MÉTHYLÈNE	62
V : EFFET DU SNP SUR LA CONTRACTILITÉ UTÉRINE	63
VI : EFFET DE LA L-ARGININE SUR LA CONTRACTILITÉ UTERINE	65
VI : EFFET DU 8-BROMO-GMPc SUR LA CONTRACTILITE UTERINE	67
DISCUSSION	69
CONCLUSIONS	76
BIBLIOGRAPHIE	78
OUVRAGES BIBLIOGRAPHIQUES	90

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

AMPc = adénosine monophosphate

ARNm = acide désoxyribonucléique messenger

ATP = adénosine triphosphate

D = dalton

EDRF = endothelium derived relaxing factor

FIV = fécondation in vitro

GMPc = Guanosine monophosphate cyclique

IP3 = inositol triphosphate

Kca channels = canaux potassiques sensibles au calcium

M = mole/litre

MLCK = myosine light chain kinase (kinase des chaînes légères de la myosine)

MLCP = myosine light chain phosphatase (phosphatase des chaînes légères de la myosine)

NO = monoxyde d'azote

NOS = NOsynthase

NOSc = NOsynthase constitutive

eNOSc = NOSc endothéliale

bNOSc = NOSc neuronale (b pour : brain)

NOSi = NOsynthase inductible

PKC = protéine kinase C

PLC = protéine lipase C

Prot G_s = protéine G inhibitrice

Prot G_s = protéine G stimulante

rPCR = reverse polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaine inverse)

SNP = sodium nitroprussiate (nitroprussiate de sodium)

SOD = super oxyde dismutase

INTRODUCTION

La physiologie de la contraction utérine reste encore aujourd'hui méconnue sur bien des points. La fibre myométriale elle-même, et ses mécanismes d'adaptation et de coopération n'ont été étudiés que par analogie avec la cellule musculaire lisse vasculaire. De même, les mécanismes permettant à l'utérus dans son entier de tolérer le développement d'un embryon puis d'un fœtus sont mal connus. Enfin, la capacité merveilleuse qu'a l'utérus de mener - le plus souvent à terme - l'enfant vers la vie par le déclenchement du travail, n'est que très partiellement comprise et plusieurs questions restent sans réponse.

Ainsi, bien que les anomalies de cette physiologie soient de mieux en mieux comprises, toutes ne bénéficient pas d'un traitement absolument efficace.

Par exemple, l'amélioration de la prise en charge des accouchements prématurés vient avant tout des progrès de la néonatalogie et de la systématisation d'une corticothérapie maternelle de maturation pulmonaire, mais les thérapeutiques médicamenteuses sur la menace d'accouchement restent aléatoires.

Dans le domaine de l'aide médicale à la procréation aussi, bien que l'implantation soit le facteur limitant (4), les moyens d'action sur celle-ci sont peu nombreux et souvent difficiles à évaluer *in vivo*. De récents travaux ont montré qu'il existait de façon certaine une corrélation négative entre le nombre de contractions utérines au moment du remplacement embryonnaire et le taux d'implantation (20). La contractilité utérine est elle-même dépendante de nombreux facteurs, tous plus ou moins dépendants du climat hormonal qui baigne l'utérus. La vascularisation, étroitement soumise aux modifications hormonales, joue une part active dans la réceptivité endométriale et le "dialogue" intercellulaire qui s'établit dès avant l'implantation.

En 1980, le monoxyde d'azote (NO) est reconnu en tant que composant biologique synthétisé par l'endothélium vasculaire (V.REF 50). Il agit sur les cellules musculaires lisses du vaisseau en les relâchant. Le pas a été vite franchi vers les applications en gynécologie-obstétrique comme agent tocolytique, par analogie histologique. Les progrès escomptés ne

sont pas encore manifestes, peut-être de par la grande difficulté à effectuer des études randomisées dans notre spécialité.

Dans cette thèse, nous avons fait le point bibliographique des connaissances actuelles sur le NO et l'utérus. Notre idée était au départ de mieux comprendre la contraction de l'utérus non gravide afin de nous rapprocher des conditions rencontrées en fécondation in vitro (FIV) au moment du remplacement embryonnaire. C'est pourquoi, dans une partie expérimentale, nous avons étudié les modifications des contractions spontanées de fragments d'utérus humains non gravides induites par un précurseur de NO, la L-arginine, ou par un donneur de NO, le nitroprussiate de sodium (SNP). Afin de mieux comprendre les mécanismes de la relaxation utérine induite par le NO, nous avons également étudié l'effet d'un inhibiteur de la guanylate-cyclase (le bleu de méthylène) qui bloque la production du 3'-5'guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et l'effet d'un analogue stable du GMPc, le 8-bromo-GMPc.

CHAPITRE 1 : LA CONTRACTION UTERINE

I : PHYSIOLOGIE DE LA CONTRACTION UTÉRINE

I.1 : ANATOMIE ET STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UTÉRUS

Nous ne reprendrons ici que l'anatomie microscopique de l'utérus dans la partie qui nous intéresse, à savoir le myomètre, ou tunique musculuse du corps et de l'isthme utérin.

Sa description a soulevé de nombreuses controverses, liées essentiellement aux moyens d'études différents utilisés par chaque auteur. Nombreux sont ceux qui ont extrapolé l'étude sur utérus gravide à l'utérus non gravide. Nous présentons ici la classique description inspirée de KAMINA (1984).

Le myomètre forme à lui seul la presque totalité de l'épaisseur de l'utérus. C'est un tissu très dense et résistant, criant presque sous le scalpel, d'environ 8 millimètres d'épaisseur. Il se compose de fibres musculaires lisses, fusiformes, groupées en faisceaux. Ces derniers, tantôt aplatis, rubanés, tantôt cordiformes, sont séparés par les lames conjonctives renforcées par un important réseau élastique. Ces faisceaux musculaires sont unis entre eux par des anastomoses terminales ou latérales et forment de nombreux plans musculaires superposés. L'orientation des faisceaux est très confuse déjà chez le fœtus. Cependant l'on peut reconnaître quatre plans musculaires superposés :

- La couche sous-séreuse, mince et de formation tardive du point de vue embryonnaire, qui reçoit des fibres du ligament propre de l'ovaire, du ligament rond, du ligament utéro-sacral et des fibres musculaires doublant les deux feuillets du ligament large. Ces fibres constituent à la surface utérine des faisceaux à prédominance transversale, qui se relèvent sur la ligne médiane en avant pour cravater le fond utérin. On isole souvent un gros faisceau médian (net sur l'utérus gravide) descendant par la face antérieure jusqu'au col : c'est le faisceau de Calza.
- La couche supra-vasculaire, qui est constituée essentiellement d'une série d'anneaux de fibres musculaires.

- La couche vasculaire, très épaisse, qui forme les deux tiers de la paroi. Ses faisceaux musculaires entrecroisés dans tous les sens forment la couche plexiforme. Les vaisseaux y sont très nombreux, et leur lumière peut s'effacer complètement lorsque le muscle utérin se contracte, les anneaux musculaires représentant les ligatures vivantes de Pinard.
- Enfin, la couche sous-muqueuse, qui est formée surtout de faisceaux circulaires se disposant en anneaux concentriques au niveau des orifices utérins –ostii tubaires et isthme, où on lui donne improprement le nom d'orifice interne du col (Figure 1).

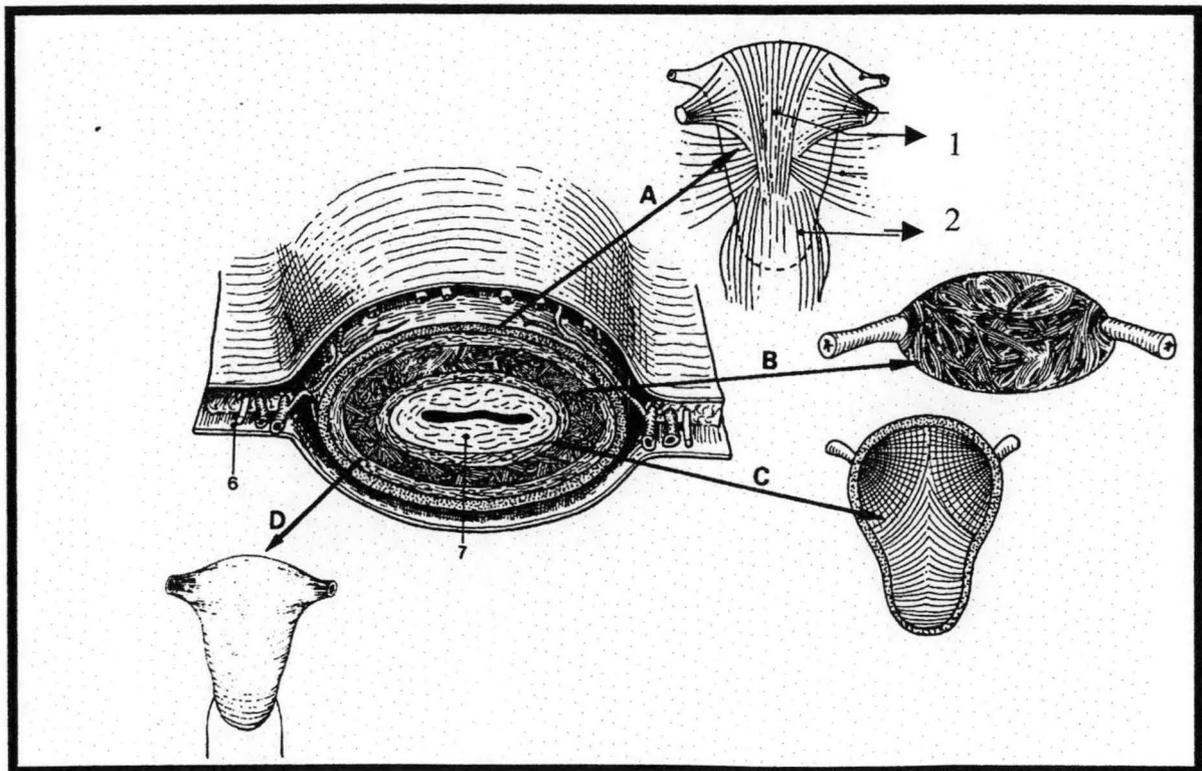


Figure 1 : différentes couches du myomètre (d'après P.Kamina, dans Anatomie gynécologique et obstétricale 1984).

A : couche sous-séreuse, B : couche vasculaire, C : couche sous-muqueuse, D : couche supra-vasculaire.

1 : fibres longitudinales médianes, 2 : fibres longitudinales utéro-vaginales. Le faisceau de Calza se trouve entre les deux.

Le tissu conjonctif représente une grande proportion du myomètre. On y trouve du collagène, des glycoprotéines et des protéoglycanes. Schématiquement sa participation va en s'accroissant du fond vers le col (Figure 2). Il a un rôle plastique et de transmission des forces contractiles engendrées par les cellules musculaires. Il contient également des fibroblastes, livre passage aux nerfs, aux lymphatiques et aux vaisseaux sanguins.

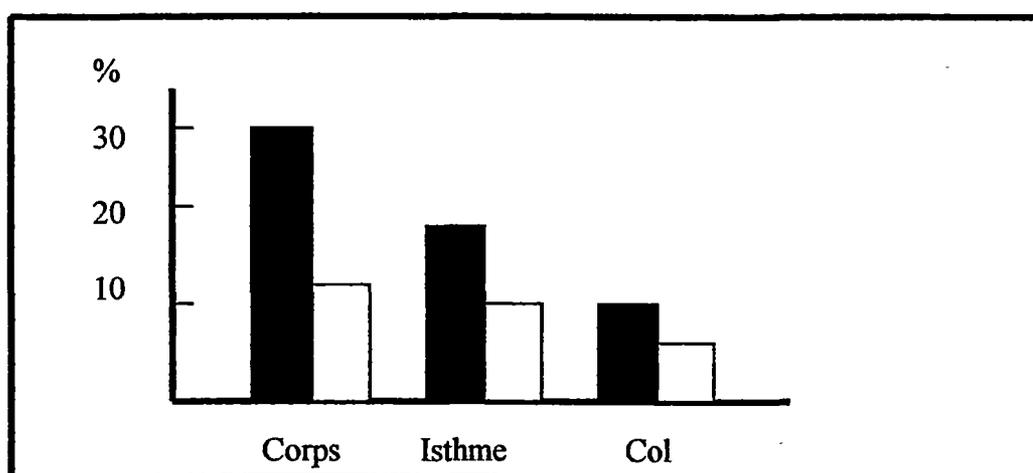


Figure 2 :répartition quantitative des fibres musculaires dans l'utérus (d'après Schwalm 1984)

■ Période d'activité génitale
 □ Ménopause

1.2 : STRUCTURE ET ULTRASTRUCTURE DE LA FIBRE MYOMÉTRIALE

La fibre myométriale est une cellule musculaire lisse fusiforme, capable de s'hypertrophier en phase oestrogénique et pendant la gestation, passant de 30 à 250 μm de longueur et de 6 à 15 μm de diamètre. Forme et taille sont très variables, dépendant des conditions hormonales et d'étirement. Plus de 80% du volume de la cellule est occupé par l'appareil contractile.

Elle est composée de différents éléments :

- la membrane plasmique. De structure trilamellaire classique, elle est séparée du tissu conjonctif environnant par une mince lame basale. De nombreuses digitations augmentent la surface cellulaire. Cette membrane plasmique possède aussi des invaginations, appelées caveolae, qui sont des vésicules de surface. A proximité du réticulum sarcoplasmique et des mitochondries, on leur attribue un rôle dans les échanges ioniques. Sur la membrane existent aussi des bandes denses, structures situées à la face interne de la membrane plasmique, servant de point d'ancrage aux filaments d'actine et aux filaments intermédiaires. C'est à leur niveau que se situent les jonctions gap.
- le réticulum sarcoplasmique. Le réticulum sarcoplasmique rugueux se situe préférentiellement autour du noyau alors que le réticulum sarcoplasmique lisse est proche de la surface cellulaire et des caveolae.(66) L'existence de ponts opaques aux électrons à cet endroit laisse supposer un couplage fonctionnel entre ces deux structures (corps denses). Le rôle du réticulum sarcoplasmique est essentiel dans la régulation de la concentration en calcium intracellulaire. C'est aussi le principal site de stockage du calcium dans la cellule.
- Les mitochondries. Elles se trouvent aussi en deux lieux préférentiels, autour du noyau et près de la membrane plasmique. Elles sont le siège du métabolisme oxydatif. Leur rôle dans la régulation du calcium intracellulaire reste limité.
- L'appareil contractile. Il se compose de filaments fins, de filaments épais, intermédiaires et des corps denses précédemment cités.

1.3 : L'APPAREIL CONTRACTILE

Comme dans le muscle strié, on retrouve dans le muscle lisse des filaments fins et épais, mais dont la distribution en est tout à fait anarchique. Ceci permet au muscle lisse une plus grande amplitude de raccourcissement et une possibilité de se contracter dans toutes les directions. La strie Z des muscles striés est remplacée par les corps denses, distribués irrégulièrement dans la cellule (29).

1.3.1 : LES FILAMENTS FINS

Ils sont principalement composés de monomères d'actine dont la composition en acides aminés ne diffère que par quelques acides aminés en N terminal de celle du muscle strié. Seul diffère le rapport filaments fins/filaments épais, plus important dans le muscle lisse. L'actine est une chaîne polypeptidique unique de poids moléculaire de 41800 daltons (D). Elle est constituée de 2 brins de 4 nm de diamètre, composés de structures globulaires organisées en conformation hélicoïdale avec 13,5 structures globulaires par tour de spire (figure 3).

Le filament d'actine est polarisé, et ceci joue un rôle dans l'interaction actine/myosine. Les filaments fins contiennent aussi par ordre décroissant de concentration, de la tropomyosine, de la caldesmone et de la filamine. Il n'existe pas dans le muscle lisse de troponine.

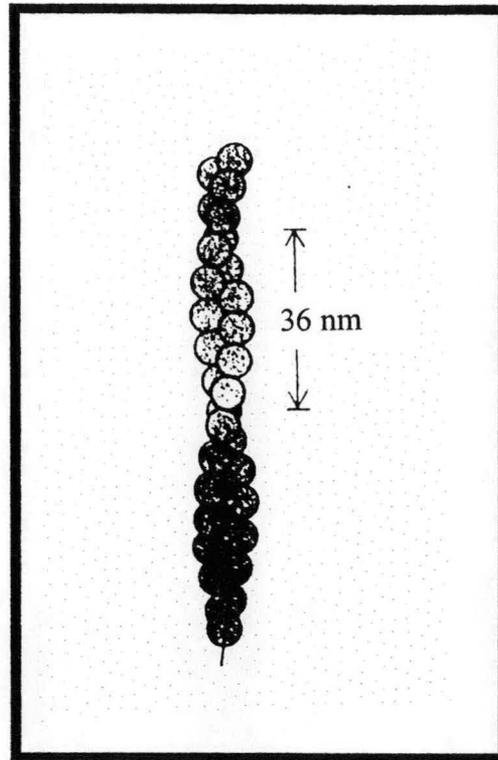


Figure 3 : représentation schématique d'un filament d'actine montrant la configuration hélicoïdale des molécules globulaires

I.3.2 : LES FILAMENTS EPAIS

Ils sont composés de myosine. Celle-ci a un poids moléculaire de 500 000 D. Elle apparaît comme une molécule allongée avec une tête formée de 2 renflements globulaires. Chaque molécule est formée de 6 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes identiques, de 200 000 D, 2 paires de chaînes légères d'environ 20 000 et 16 000 D chacune. Les deux chaînes lourdes s'enroulent l'une avec l'autre selon une conformation hélicoïdale, et forment une sorte de queue se terminant par les 2 têtes globulaires. Chacune de ces têtes est accompagnée d'une chaîne légère de chaque paire (figure 4).

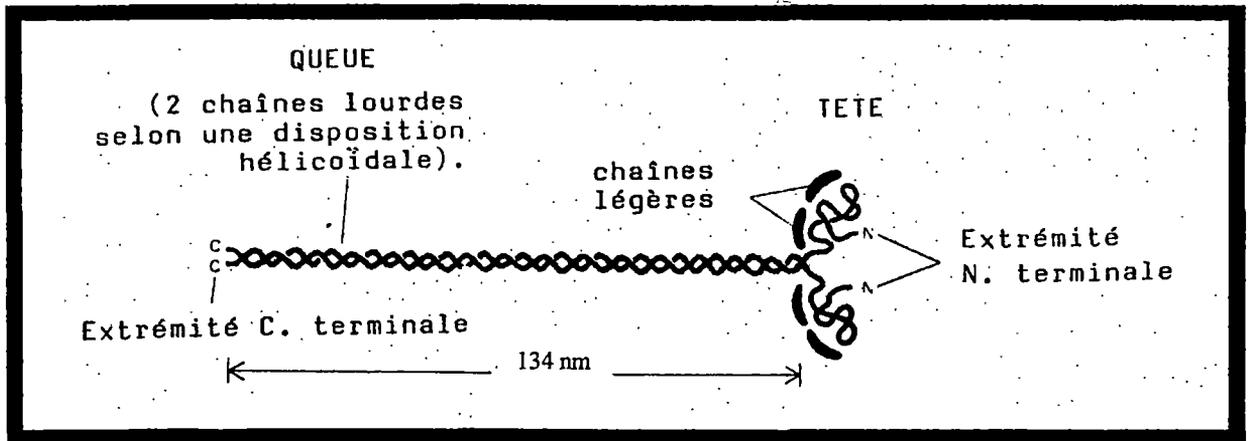


Figure 4 :représentation schématique d'une molécule de myosine
Chacune des 2 têtes porte une chaîne légère de chaque type.

La tête globulaire porte 3 sites fondamentaux pour la contraction :

- un site d'interaction avec l'actine.
- un site de fixation de la chaîne légère de 20 KD dont la phosphorylation est le principal élément régulateur de la contraction.
- un site enzymatique à activité ATPase.

I.3.3 : LES FILAMENTS INTERMEDIARES

Ils sont constitués principalement de 2 protéines : la desmine, majoritaire, et la vimentine. Elles n'ont pas d'action contractile propre mais semblent jouer un rôle dans la cohésion et la constitution du cytosquelette, avec les corps denses auxquels elles sont amarrées.

I.3.4 : LES CORPS DENSES

De structure opaque aux électrons, ils sont répartis dans tout le cytoplasme, très riches en alpha-actinine et sont, de ce fait, considérés comme des équivalents fonctionnels des stries Z du muscle strié. Ils servent de point d'ancrage aux filaments fins et intermédiaires, et contribuent à la constitution du cytosquelette.

I.4 : LA CONTRACTION UTERINE

I.4.1 : ACTIVITE ELECTRIQUE

Le muscle lisse viscéral dont l'utérus est un représentant, est caractérisé par l'instabilité de son potentiel de membrane et par le fait qu'il présente des contractions continues et irrégulières indépendantes de toute innervation. Cet état permanent de contraction partielle s'appelle le tonus. Le potentiel de membrane n'a pas de valeur réelle de "repos". De plus, il est aussi sous l'influence du cycle hormonal. Ce potentiel est bas quand le tissu est actif, plus élevé quand il est inhibé. Dans les périodes de repos relatif, sa valeur moyenne est d'environ -50 mV. C'est le gradient ionique qui permet ce potentiel. En effet, le milieu intracellulaire est riche en K^+ et pauvre en Na^+ et Cl^- , à l'inverse du milieu extracellulaire. Le gradient existe grâce aux différents niveaux d'activation des canaux membranaires qui définissent une perméabilité sélective. La technique du « patch-clamp » permet maintenant d'étudier l'électrophysiologie des cellules (62). Il existe plusieurs types de canaux potassiques, en particulier les canaux potassiques calcium dépendants (KCa channels) et les canaux potassiques ATP-dépendants (62).

Le muscle commence à se contracter 200 ms après le début du potentiel de pointe et donc 150 ms après que le potentiel d'action soit terminé. Le maximum de la contraction n'est

donc atteint que 500 ms après le potentiel de pointe. Le couplage excitation/contraction est donc un phénomène très lent comparé à la contraction du muscle squelettique et cardiaque.

Le muscle lisse viscéral est particulier car il se contracte quand il est étiré. L'étirement est suivi d'une diminution du potentiel de membrane, d'une augmentation de la fréquence des potentiels d'action et d'une augmentation générale du tonus.

Il n'existe pas de corrélation linéaire force/longueur, mais un comportement qui correspond plus à celui d'une masse visqueuse que d'un tissu solide, propriété que l'on appelle plasticité.

Il semble que chaque cellule soit capable de s'activer spontanément, c'est à dire que chaque fibre puisse être "pace-maker". D'autre part, chaque cellule peut présenter un potentiel d'action par activité électrique propagée, elle est alors dite "pace-follower" (66).

La fréquence, la durée et l'amplitude des contractions sont liées à la fréquence de potentiels d'action générés par les potentiels "pace-maker", au nombre de potentiels d'action produit dans chaque cellule "pace-follower" et au nombre de cellules mises en jeu dans l'événement contractile. Ainsi la propagation d'un potentiel unique provoque une contraction d'amplitude et de durée limitée, des salves de potentiels propagés provoquent une contraction plus forte et plus longue. Le blocage de la conduction se traduit par une réduction de l'amplitude et de la durée des contractions.

I.4.2 : LES JONCTIONS GAP

Les jonctions gap sont les sites de passage ionique privilégié entre les cellules. Elles assurent un couplage électrique intercellulaire et permettent vraisemblablement la transmission des potentiels d'action d'une cellule à l'autre.

Des études réalisées en microscopie électronique à haute résolution ont révélé que chaque jonction gap est composée de plusieurs canaux intercellulaires. Chaque canal est

formé par l'arrangement hexagonal de 6 sous-unités protéiques autour d'un pore central. L'espace inter-membranaire est réduit à 2 nm et les canaux sont perméables aux ions inorganiques, à différents métabolites (tels que peptides et glucides) et aux seconds messagers (tels le GMPC).

Leur rôle dans le contrôle de la contractilité est beaucoup étudié. Ainsi leur expression est variable au cours du cycle menstruel et est minimale au quatrième jour post-ovulatoire (2), semblant ainsi préparer l'implantation. Ces résultats vont dans le sens de récents travaux ayant prouvé une corrélation négative entre implantation embryonnaire en FIV et contractions utérines (20). De plus, la sensibilité aux contractions calcium-induites semble chez la souris influencée pendant la grossesse par des facteurs locaux, puisque les 2 cornes des utérus de rates ne réagissent pas de la même façon selon que la grossesse y soit implantée ou pas (53). Les jonctions gap permettent une régulation lente du couplage intercellulaire, leur expression et leur dégradation se couplant aux "besoins" de l'utérus, c'est à dire s'adaptant à la phase du cycle ou au moment de la gestation.

I.4.3 : INTERACTION DES PROTEINES CONTRACTILES

Le raccourcissement cellulaire puis musculaire qui découle de l'interaction des protéines contractiles est expliqué par le glissement des filaments d'actine entre ceux de myosine. Les têtes globulaires de la myosine s'accrochent à l'actine puis se décrochent de façon répétitive, produisant à chaque mouvement élémentaire un déplacement d'un filament par rapport à l'autre.

C'est essentiellement au niveau de la myosine que se produit la régulation de son interaction avec l'actine. Seule la myosine phosphorylée est capable d'interagir avec l'actine. Cette phosphorylation est assurée par la kinase des chaînes légères de la myosine ou "myosin

light chain kinase”(MLCK) dont l'activité est elle-même sous la dépendance de 3 facteurs (70) :

- la formation d'un complexe Ca^{++} /calmoduline. Il est comme une sous-unité de la MLCK. Pour une concentration intracellulaire en Ca^{++} d'au moins 10^{-6} M, ce complexe se fixe à la MLCK qu'il active. La calmoduline se comporte comme un “ testeur ” de la concentration en Ca^{++} , puisqu'elle doit fixer 4 ions calcium pour interagir avec la MLCK. Cette capacité d'interaction est dévoilée par la modification de la conformation induite par la fixation des ions calcium (3).
- Le taux d'AMP cyclique (AMPc). Une augmentation de celui-ci inhibe la MLCK. En effet, l'AMPc active une protéine-kinase AMPc dépendante qui phosphoryle la MLCK et la rend inactive par diminution de son affinité pour la calmoduline. Peut-être le GMPc joue-t-il également un rôle en inhibant la MLCK sur des cultures de cellules utérines (76).

- Le taux de GMPcyclique (GMPc). Le GMPc exerce ses effets biologiques par l'intermédiaire d'une protéine kinase GMPc-dépendante (PKG), et joue le rôle de second messager. Les mécanismes par lesquels le GMPc et la PKG exercent leurs effets relaxants restent encore mal connus. Les PKG phosphorylent de nombreuses protéines au niveau de la cellule musculaire lisse. Cependant, compte tenu du rôle essentiel du Ca^{++} dans la régulation du muscle lisse, plusieurs hypothèses suggèrent que l'augmentation du GMPc produirait une baisse de Ca^{++} par trois mécanismes (59):

- diminution du Ca^{++} cytoplasmique par accroissement de l'extrusion vers le milieu extracellulaire et de la recapture du Ca^{++} vers le réticulum sarcoplasmique.

- Inhibition de l'entrée du Ca^{++} par blocage des canaux calciques transmembranaires.

- Inhibition des voies de transduction conduisant à l'augmentation du Ca^{++} en particulier la voie de la PLC et de l'IP3 (61). Cette voie expliquerait la modulation de la contractilité par le NO en cas de contraction déclenchées par l'activation d'une protéine G.

La figure 5 traduit mieux que de longues explications les cascades aboutissant à la contraction de la fibre utérine.

Dans la figure 6 sont résumés les principaux équilibres qui vont conditionner l'état de la fibre musculaire. Les agonistes vont sensibiliser l'appareil contractile au Ca^{++} en augmentant l'activité de la MLCK et activant la protéine kinase C (PKC). Au contraire, les protéines kinases A ou G en renforçant l'activité de la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP) ont un effet désensibilisant au Ca^{++} .

Dans la figure 7 sont exposés les modes d'actions du GMPc sur une cellule musculaire vasculaire lisse.

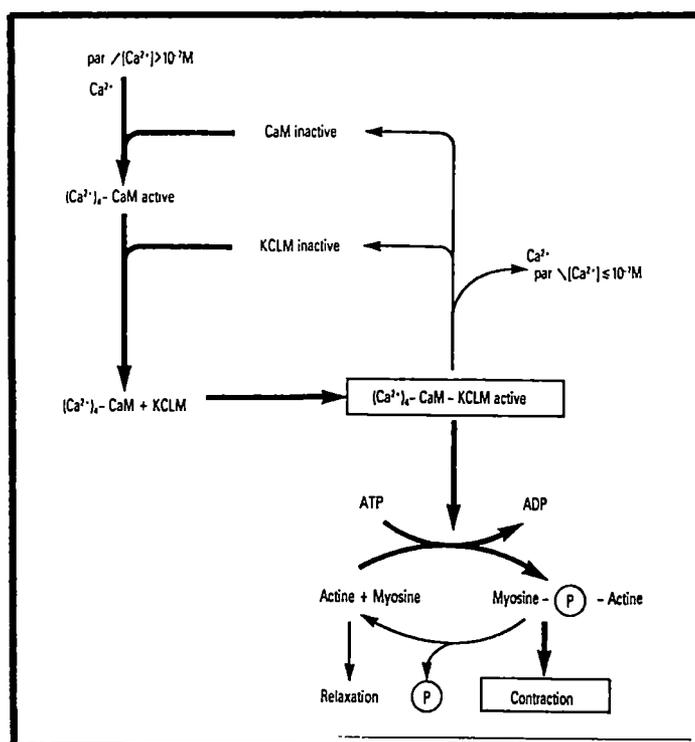


Figure 5 : régulation de la contractilité par phosphorylation/déphosphorylation de la myosine. 'D'après J.L Freslon dans Pharmacologie moléculaire. 1989)
 CaM = calmoduline, KCLM = kinase des chaînes légères de la myosine,
 ➔ Voies conduisant à la contraction par phosphorylation de la myosine
 ➔ Voies conduisant à la relaxation par déphosphorylation de la myosine

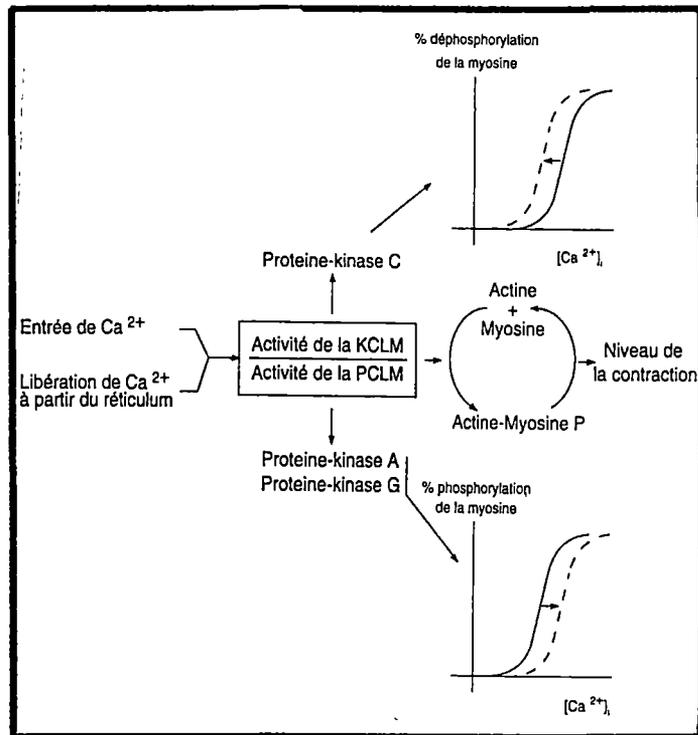


Figure 6 : mécanismes cellulaires régulant la contractilité du muscle lisse.

(D'après J.L Freslon dans **** année ****)

MLCK = kinase des chaînes légères de la myosine, MLCP = phosphatase des mêmes chaînes.

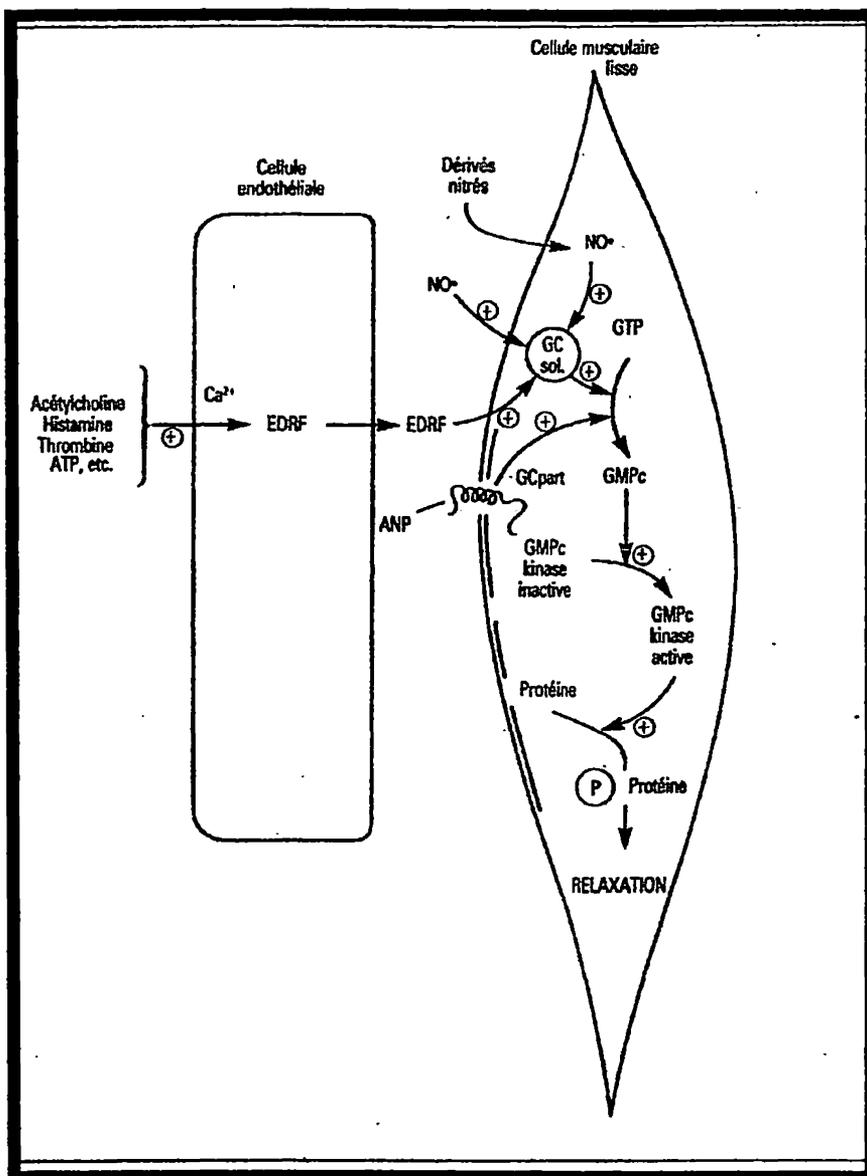


Figure 7 : mode d'action du GMPc sur la cellule vasculaire lisse
 GCpart = guanylate cyclase particulaire GCsol = guanylate cyclase soluble

I.4.4 : REGULATION DE LA CONCENTRATION DU CALCIUM LIBRE INTRACELLULAIRE

Comme nous venons de le voir, la concentration du calcium libre intracellulaire est le principal facteur de régulation de la contraction utérine. Trois phénomènes conduisent à l'augmentation de la concentration du calcium libre intracellulaire :

- La dépolarisation de la membrane plasmique induite par les potentiels d'action. Elle met en jeu des canaux calciques dépendants du voltage (VOC = voltage operating channel) dont l'ouverture permet la diffusion passive du calcium extracellulaire vers le cytoplasme.
- La liaison d'un agoniste à son récepteur membranaire. Cette liaison peut provoquer l'ouverture d'un canal calcique récepteur dépendant (ROC = receptor operating channel) et/ou, via l'activation de la phospholipase C (PLC), provoquer la formation d'inositol triphosphate (IP3) qui provoque la libération du Ca^{++} stocké dans le réticulum sarcoplasmique.
- Les stimuli mécaniques, qui, par l'activation de canaux sensibles à l'étirement (SAC = stretch activated channels), pourraient aussi favoriser l'entrée de Ca^{++} .

La relaxation nécessite que la concentration en calcium libre ^{Intra ??} extracellulaire soit inférieure à 0.1 μM . Ceci implique donc un efflux contre le gradient électrochimique ainsi qu'une mobilisation vers les sites de stockage intracellulaires. Trois phénomènes peuvent être individualisés :

- au niveau de la membrane plasmique, une $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{++}/\text{ATPase}$ activée par le complexe calcium/calmoduline est responsable de l'efflux de Ca^{++} (64). L'existence d'un transport ATPase indépendant a été démontré sur l'utérus de rate (15)
- toujours au niveau de la membrane plasmique, une pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ échange 3 ions Na^+ contre la sortie d'un ion Ca^{++} . Ce mécanisme électrogénique ne nécessite pas de consommation d'ATP.

- enfin, au niveau du réticulum sarcoplasmique, la principale pompe calcique serait également une $Mg^{2+}/Ca^{++}/ATPase$ différente de celle de la membrane plasmique. Le retour du calcium vers le réticulum sarcoplasmique serait également favorisé par la présence de protéines liant spécifiquement le Ca^{++} , telle la calséquestrine (77).

1.4.5 : LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES ET LES SECONDS MESSAGERS

La cellule musculaire lisse utérine possède à sa surface des récepteurs membranaires dont l'activation par différents agents va avoir un effet relaxant ou procontractile. Deux types de seconds messagers ont été individualisés :

- **les phospho-inositides.** De nombreux agents (ocytocine, vasopressine, agonistes $\alpha 1$ -adrénergiques, acétylcholine), activent le système phospho-inositides/phospholipase C. (voir figure 8). L'IP3 est le principal second messager de ce système et est responsable d'une élévation du Ca^{++} intracellulaire et donc d'une contraction.

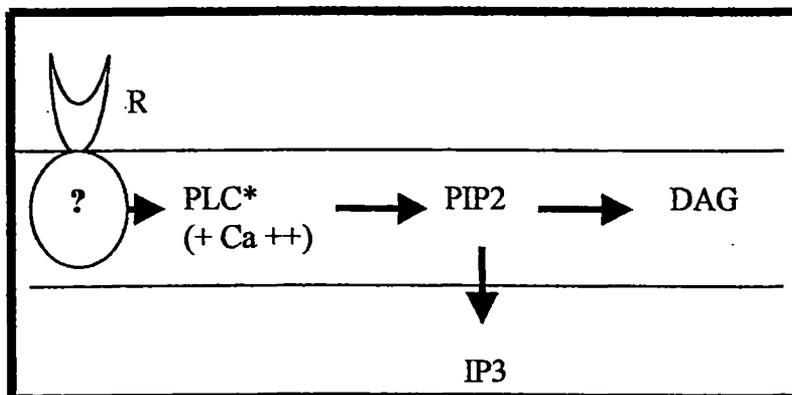


Figure 8 : activation de la voie des phospho-inositides par la PLC.

PIP2 = phosphatidyl-inositol diphosphate

IP3 = inositol 1.4.5

triphosphate

DAG = diacylglycérol

- **l'AMPC**, via le système protéine G/adényl cyclase. La protéine G est une protéine membranaire fixant les nucléotides cycliques. Elle permet la communication entre le récepteur et les enzymes effectrices responsables de la production des seconds messagers intracellulaires (ici en l'occurrence l'AMPC). La protéine G possède 3 sous-unités α , β et

γ . C'est la sous unité α qui est différente selon qu'il s'agisse de protéine G activatrice (Prot Gs) ou d'une protéine G inhibitrice (prot Gi). Cette sous-unité a une activité GTPasique, transformant le GTP en GDP. Les protéines G sont les principales clés du dialogue hormonal. Chaque récepteur peut activer plusieurs protéines G qui sont elles-mêmes susceptibles d'activer ou inhiber plusieurs cyclases (figure 7).

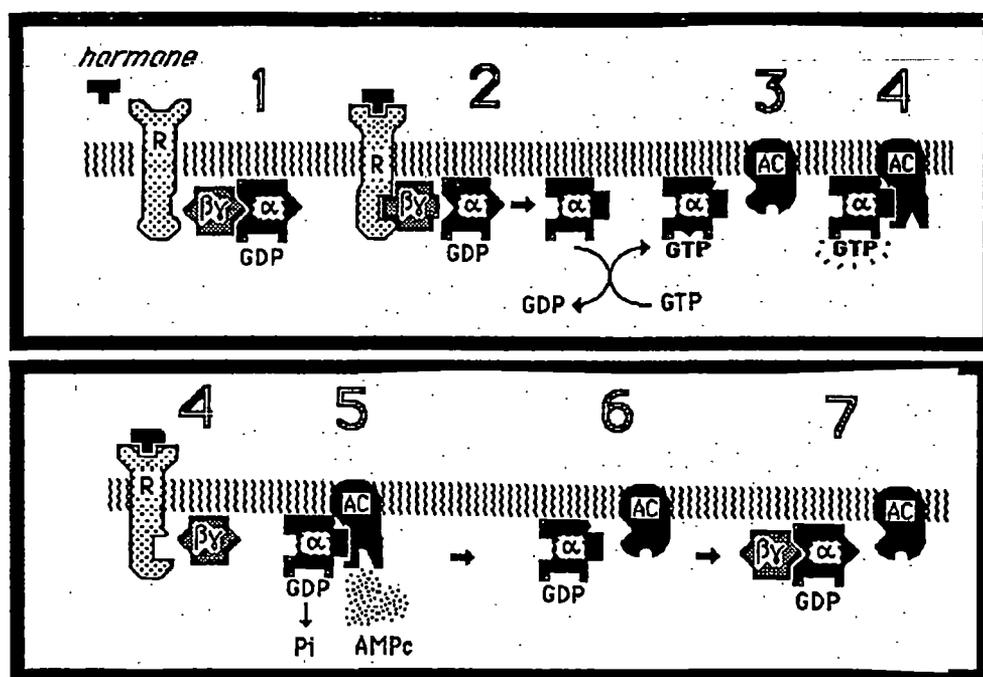


Figure 7 :Système adényl cyclase/AMPc et protéine G.(d'après J.Pelmont dans Enzymes 1990).

AC = adényl cyclase.R = récepteur. On note qu' α est une ATPase.

L'AMPc active alors une protéine kinase de type A (PKA) qui va agir à plusieurs niveaux. D'abord, comme nous l'avons déjà mentionné, en phosphorylant la MLCK et en la rendant inapte à phosphoryler la chaîne légère de la myosine. Ensuite en favorisant l'influx de Ca^{++} dans la cellule, puis enfin en augmentant sa séquestration intra sarcoplasmique.

I.4.6 : RECAPITULATIF DES DIFFERENTS INTERVENANTS DANS LA CONTRACTION DE LA FIBRE MUSCULAIRE UTERINE

La régulation de la contractilité utérine est comme nous venons de le voir sous l'interdépendance de nombreux facteurs, souvent la résultante de réactions en chaînes, et la présence de nombreux récepteurs membranaires et des protéines G permet d'envisager une régulation très fine du tonus utérin. La figure 8 fait une synthèse de tous ce qui a été écrit précédemment.

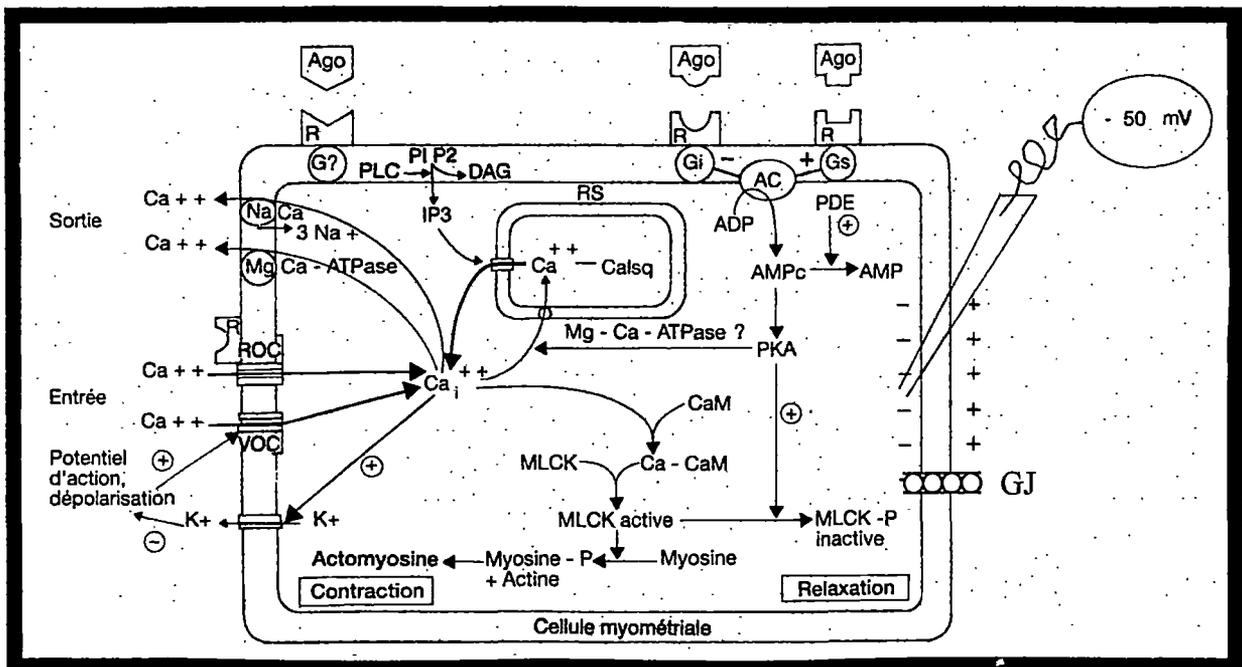


Figure 8 : schéma résumant les différents niveaux de régulation de la contraction de la fibre utérine. (d'après G.Germain et col, dans l'encyclopédie médicochirurgicale 1996)
 RS = réticulum sarcoplasmique, Calsq = calséquestrine, CaM =calmoduline,
 Ago = agoniste, GJ = « gap-junction ».

CHAPITRE 2 : LE MONOXYDE D'AZOTE

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz connu de longue date comme molécule inorganique simple. Mais depuis les années 80 il est établi que le NO possède des propriétés biologiques, à savoir être un messager intercellulaire mais aussi un poison cellulaire.

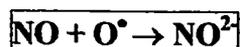
Dès cette époque la présence d'un facteur diffusible, identifié sous le nom d'EDRF, qui induisait une relaxation des vaisseaux dépendante de la présence de l'endothélium était connue (46). Après bien des tâtonnements (54, 46,22), le NO a été identifié comme ce facteur, ouvrant la voie à de nouvelles recherches, dans des domaines aussi variés que la cardiologie, la neurophysiologie et la gynéco-obstétrique.

I : PRESENTATION DU GAZ

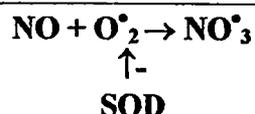
Le NO est un gaz incolore de poids moléculaire 30 g. Il possède 11 électrons de valence et 1 électron célibataire. Il diffuse librement en solution aqueuse, est très liposoluble. Il franchit ainsi très librement les membranes cellulaires et, bien qu'il ne possède pas de récepteur spécifique, il a une action intracellulaire que nous détaillerons par la suite.

Ses propriétés biochimiques sont responsables de nombreux effets physiologiques ou pathologiques. C'est une molécule très réactive. Par exemple (V.Ref 50 jcp) :

- le NO réagit avec l'oxygène moléculaire pour former l'ion nitrite.



- le NO réagit avec l'anion superoxyde pour former l'ion nitrate. La super oxyde dismutase (SOD) empêche cette réaction.



- Le NO réagit avec l'hémoglobine pour donner HbNO. Les groupements héminiques sont très avides de NO, comme toutes les métalloprotéines.

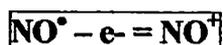
II : DETECTION DU NO ET DOSAGE

Le NO a une demi-vie très courte de l'ordre de quelques millisecondes. Sa détection et son dosage sont donc difficiles, à fortiori *in vivo*. C'est pourquoi il n'est pas dosé directement. Cependant, la quantification de produits de dégradation constitue une approche indirecte d'évaluation de la production de NO.

- **le dosage des nitrites** (30), se fait par une réaction **colorimétrique** "rouge-violet" qui présente une sensibilité de détection de l'ordre de 10^{-6} M.
- **le dosage des nitrates**, réalisé par **spectrophotométrie** UV, permet une détection de l'ordre de 10^{-4} M. Toujours en spectrophotométrie, la réaction de NO avec l'oxyhémoglobine conduit à la formation de méthémoglobine. Cette conversion est visualisée par déplacement du spectre UV. Sa limite de détection de l'ordre de 10^{-9} M.
- **l'évaluation par chémoluminescence** a été développée pour doser le NO dans l'atmosphère. En mettant en réaction NO sur l'ozone un photon est émis par un intermédiaire instable. La sensibilité de détection est de l'ordre de 10^{-12} M.
- **la détection par résonance paramagnétique électronique**. Cette méthode spécifique de détection dans un système biologique donné pose un certain nombre de problèmes de mise en œuvre puisqu'il faut absolument stabiliser au préalable le radical NO^{\bullet} , soit par des composés nitrosylés (57), soit par de l'hémoglobine. Cette méthode peu sensible est cependant très spécifique, et permet de déterminer la présence et la localisation des complexes nitrosylés (28).

- **les méthodes ampérométriques.** Elles ont permis de grands progrès par l'introduction de sonde souples permettant le dosage *in vivo*. Elles sont de plus très sensibles. Une électrode à oxygène modifié détecte le NO par son oxydabilité.

Le principe repose sur le fait que les métalloporphyrines catalysent l'oxydation de NO selon l'équation :



On mesure alors le courant induit par cette perte d'électron, avec une sensibilité de l'ordre de 10^{-20} M !

III : SYNTHÈSE DU NO

C'est en 1988 que la L-arginine a été mise en évidence comme étant le précurseur du NO dans les cellules endothéliales (V.Ref FS 2). Palmer et al (V.Ref 70 JCP) ont définitivement prouvé que le NO se formait à partir de l'atome guanidinonitrogène terminal de la L-arginine sous l'effet de la NOSynthase. Cette conversion est spécifique puisque les analogues de la L-arginine ne sont pas des substrats de cette réaction.

La réaction enzymatique menant de la L-arginine au NO s'effectue en deux étapes. Une première hydroxylation de l'un des groupements guanidine nitré génère le composé intermédiaire Ng-hydroxy L-arginine, suivie d'une deuxième hydroxylation résultant en la dégradation spontanée du composé intermédiaire en monoxyde d'azote et L-citrulline (figure 9).

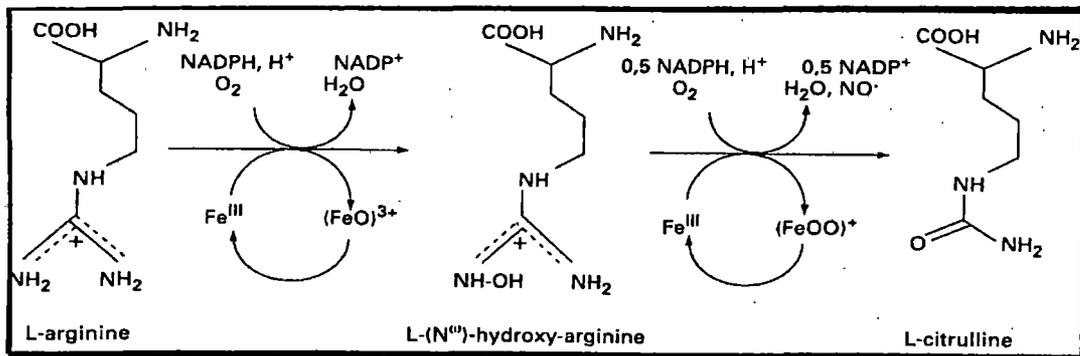


Figure 9 : synthèse du NO à partir de la L-arginine sous l'effet de la NOSynthase (la NOS est dimérisée dans la nature)

La réaction enzymatique nécessite, en supplément de la L-arginine, la NADPH et l'oxygène comme co-substrats, la tétrahydrobioptérine, des flavines (FMN et FAD) et la calmoduline comme co-facteurs. La fonction précise de chaque co-facteur n'est pas entièrement connue.

Il est intéressant de noter que la L-citrulline est reconvertie en L-arginine par incorporation d'un groupement urée, permettant tout à la fois d'épurer les déchets du métabolisme cellulaire et d'assurer une présence de L-arginine.

IV : LES NO-SYNTHASES

Dans les cellules des mammifères, les NO-synthases, apparentées aux cytochromes P450, peuvent être classées en deux catégories majeures :

- les NO-synthases « constitutives » (NOSc), présentes dans l'équipement enzymatique de base de certaines cellules. Leur masse moléculaire est d'environ 133 kDa. Leur activation est dépendante de la concentration en Ca^{++} intracellulaire. Elles peuvent être activées par la stimulation de récepteurs endothéliaux spécifiques à certains médiateurs neuro-humoraux, et par les forces de cisaillement (figure 10.1). Deux types de NOSc ont été décrits, la NOSc endothéliale (eNOSc), mise en évidence la première dans l'endothélium

des vaisseaux, et la NOSc neuronale (bNOSc), mise en évidence dans les structures cérébelleuses initialement.

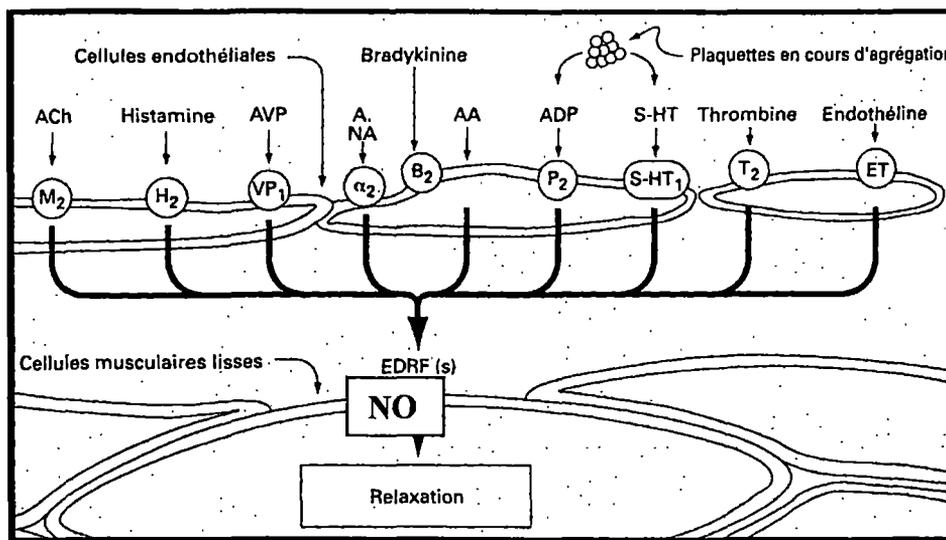


Figure 10.1 : Médiateurs neuro-humoraux agissant sur la cellule musculaire lisse et conduisant à l'activation des NOSynthases. (D'après J.Pelmont dans « Enzymes » 1990)

- Les NOSynthases « inductibles » (NOSi), qui peuvent être exprimées dans la plupart des cellules vasculaires en réponse à certains médiateurs de la réaction inflammatoire (figure 10.2). Leur masse moléculaire est de 130 KD. La production de NO qu'elle induit est progressive dans le temps avec une certaine latence liée à la nécessité d'une transcription génomique.
- Chaque isoenzyme a donc un mode de fonctionnement particulier, et répond à un besoin différent de l'organisme. Les principales caractéristiques de chacune sont résumées dans le tableau 1.

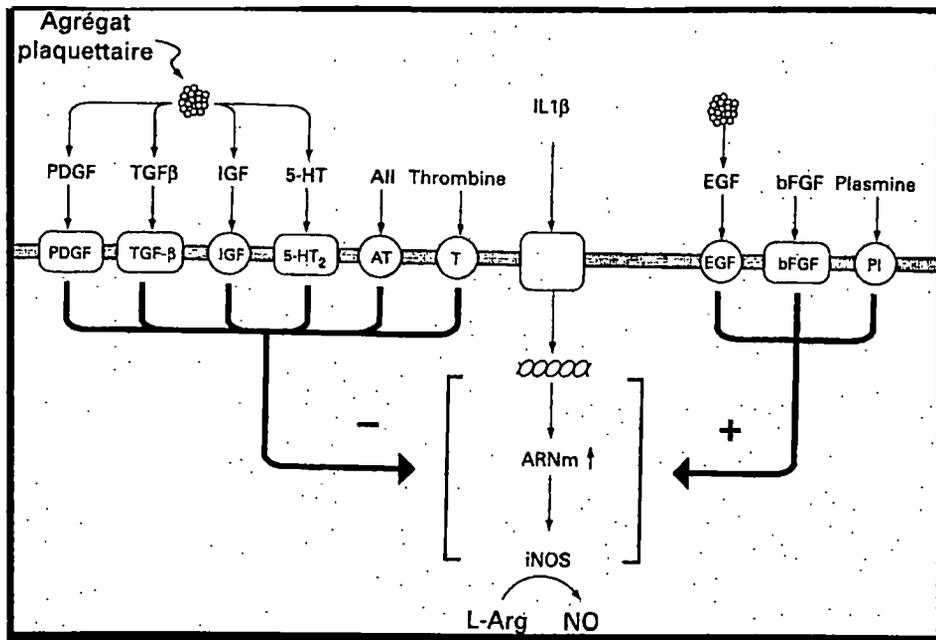


Figure 10.2 : différents médiateurs inflammatoires activant la synthèse de NOSi

NO-synthase constitutive	NO-synthase inductible
-enzyme cytosolique	-enzyme cytosolique
-NADPH dépendante	-NADPH dépendante
-Dioxygénase	-Dioxygénase
-actions inhibées par les analogues de la L-arginine	-actions inhibées par les analogues de la L-arginine
-Calcium dépendante	-Calcium indépendante
-Libérant de faible doses de NO (picomoles)	-Libérant des doses de NO plus importantes (nanomoles)
-libération de courte durée de NO, suite à l'activation de l'enzyme (sec)	-libération prolongée de NO suite à l'activation de l'enzyme (min, heures)
-insensible à l'action des corticoïdes	- induction enzymatique inhibée par les glucocorticoïdes.

Tableau 1 : différentes caractéristiques des NOS constitutives et inductibles

V : MODE D'ACTION ET EFFET DU NO

C'est dans le système vasculaire que l'action du NO est la mieux connue. Il a été démontré qu'une synthèse continue de NO, produite par la NOSc, contribuait à la régulation du tonus de base des vaisseaux.

Le NO induit alors une activation de la guanylate cyclase. Cette enzyme possède dans sa structure un groupement héminique dont la présence est essentielle à l'activation par le NO. Ce complexe hème/NO ressemble d'un point de vue structural à la protoporphyrine IX, précurseur déméthylé de l'hème, capable lui aussi d'activer la guanylate cyclase.

L'activation de la guanylate cyclase conduit à la formation d'un nucléotide cyclique, le GMPc, à partir du GTP, qui, comme nous l'avons déjà décrit, entraîne une relaxation du muscle lisse.

Différents facteurs de l'inflammation sont susceptibles de stimuler l'expression de NOSi et d'augmenter la production de NO (figure 10.2). La NOSi a une activité enzymatique prolongée et maximale, et peut générer du NO pendant des heures, voire des jours. La synthèse de cette isoenzyme est régulée au niveau de son gène.

La NOSi est susceptible d'être induite dans différentes cellules : polynucléaires, macrophages, cellules de Küpffer et hépatocytes, certaines cellules carcinomateuses animales, cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires ... (1).

Il a été mis en évidence un effet bénéfique de cette NOSi dans les vaisseaux dont l'endothélium a été lésé par un cathétérisme par exemple. La NOSc n'assure plus une production suffisante de NO et celui-ci est alors produit par la voie de la NOSi. En revanche, la NOSi est mise en cause dans le choc vasoplégique du choc septique (46)

Le NO produit par cette NOSi peut aussi avoir un rôle dans l'action cytotoxique/cytostatique des macrophages activés vis-à-vis de bactéries et de cellules tumorales. Enfin, le NO inhiberait certaines enzymes nécessaires à la respiration mitochondriale (NADPH-ubiquinone oxydoréductase et succinate ubiquinone oxydoréductase) (V.Ref 39 dans l'inflammation), au cycle de l'acide citrique et à la synthèse d'ADN dans les cellules cibles.

VI : INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DE NO

Les analogues de la L-arginine et ses dérivés agissent comme des inhibiteurs de la synthèse de NO par leur action compétitive au niveau de la NOS. C'est grâce à ses différents inhibiteurs que la L-arginine a été identifiée comme étant le précurseur du NO (48,58). Il existe des inhibiteurs plus spécifiques des formes inductibles (L-cavananine) ou des formes constitutives (N ω -propyl L-arginine). La figure 11 présente les différentes structures de la L-arginine et de ses principaux analogues. Le plus puissant inhibiteur est la L-NIO (N-iminoéthyl L-ornithine).

Il existe aussi des inhibiteurs agissant sur les cofacteurs de la NOS. Enfin, le NO exerce un rétro-contrôle négatif sur sa propre synthèse.

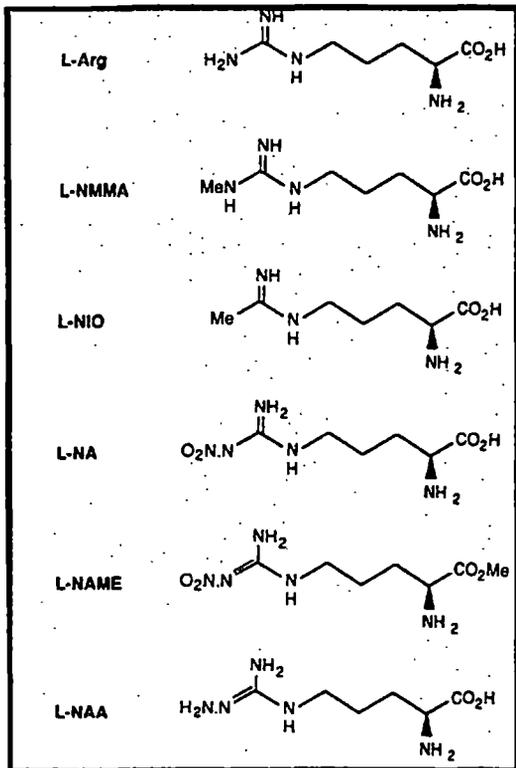


Figure 11 : structure de la L-arginine et des analogues inhibant la production de NO. (d'après S.Moncada et al, V.ReffS2)

L-arg :L-arginine

L-NMMA : N ω -monométhyl L-arginine.

L-NIO : N-iminoéthyl L-ornithine

L-NA : N ω -nitro L-arginine

L-NAME : N ω -nitro L-arginine méthyl ester

L-NAA : N ω -amino L-arginine

VII : APPORT EXOGENE DE NO

VII.1 : A PARTIR DES DERIVES NITRES

Connus et utilisés depuis plus d'un siècle dans le domaine cardio-vasculaire, les dérivés nitrés produisent du NO par un mécanisme incomplètement compris. Ces dérivés très liposolubles pénètrent facilement dans la cellule musculaire lisse. Leur biotransformation est incomplètement décrite, mais conduit à la production de NO par une série de réactions de réduction. L'hypothèse actuellement retenue suggère que cette biotransformation nécessite la présence dans la cellule musculaire de groupements réducteurs sulfhydryl(-SH), conduisant à la formation de nitrosothiols et de NO (figure 12). Le rôle de la L-cystéine est largement suspecté (63) comme source cellulaire de glutathion.

Il est probable que les mécanismes conduisant à la libération du NO sont multiples et qu'il existe une voie enzymatique et une voie non enzymatique pour une faible part.

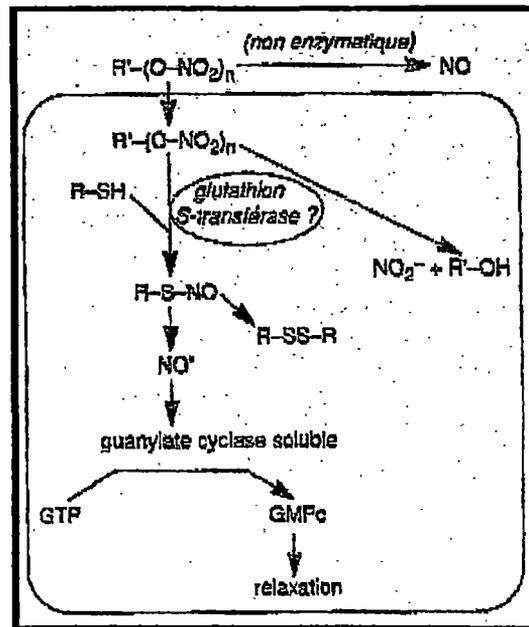


Figure 12 : mécanisme potentiels de la biotransformation des dérivés nitrés. (d'après V.Richard (59))

VII.2 : A PARTIR DES DERIVES DES SYDNONIMINES

Les dérivés des sydnonimines, dont la prodrogue la plus connue est la molsidomine (Corvasal®) sont largement utilisés dans le domaine cardio-vasculaire

De nombreuses données suggèrent que les sydnonimines, tel le SIN-1, libèrent le NO de façon spontanée en solution. Le SIN-1 est le métabolite actif d'une prodrogue, la molsidomine (ou Corvasal®). L'hydrolyse de la molsidomine est réalisée par des estérases hépatiques conduisant au SIN-1 ; suit une réaction non enzymatique dépendant du pH, qui conduit à SIN-1A. L'oxydation produit alors du NO et du SIN-IC, inactif. Il y a simultanément formation d'anions superoxydes, qui vont activer la décomposition du SIN-1 et accélérer la dégradation de NO en nitrites et nitrates. C'est pourquoi, dans ce cas encore, la SOD potentialise l'action de ces dérivés.

VIII : ACTION DU BLEU DE METHYLENE

Le bleu de méthylène est considéré comme un inhibiteur non spécifique de la guanylate cyclase. Il est couramment utilisé pour mettre en évidence la voie du GMPC dans certains processus de relaxation.

Mais d'autres mécanismes, mal connus, sont impliqués, comme l'inactivation du NO par production de radicaux libres oxygénés en présence de bleu de méthylène (48) ou l'ouverture des canaux potassiques calcium dépendants à large conductance (69).

CHAPITRE 3 : UTERUS ET NO

Il était tentant, par analogie avec la musculature vasculaire lisse, d'extrapoler à l'utérus les découvertes faites sur le mode d'action du NO dans les vaisseaux. De très nombreuses études ont été menées sur le sujet, tant en gynécologie qu'en obstétrique, suscitant de grands espoirs. Qu'en est-il actuellement ? De quoi peut-on être sûr ?

I : Y A-T-IL DES NOSYNTHASES DANS L'UTERUS ?

Tous les auteurs s'accordent sur ce point : l'utérus, animal ou humain, possède l'équipement enzymatique pour transformer la L-arginine en NO (V.REF 30,33,34,35,36).

Les NOS sont retrouvées dans le myomètre (surtout dans les myocytes et les cellules endothéliales des vaisseaux), dans le col, dans l'endomètre (surtout dans sa phase sécrétoire), et pendant la grossesse dans le trophoblaste, les membranes fœtales et le placenta. On retrouve surtout des NOS constitutives endothéliales, sauf dans le col pendant le travail où l'on retrouverait principalement des NOS inductibles.

L'expression de ces NOS serait bien contrôlée par les stéroïdes sexuels, mais pas uniquement car on retrouve encore des NOS dans le myomètre d'utérus post-ménopausiques (V.REF 35).

II : LE NO JOUE-T-IL UN ROLE DANS L'UTERUS ?

Là encore, les auteurs sont unanimes, le NO est un grand acteur de la physiologie utérine. Mais son mode d'action n'est pas parfaitement compris.

II.1 : ROLE DU NO DANS LE CYCLE

C'est par son rôle pro-hapoptotique que le NO agirait pendant la phase sécrétoire du cycle et surtout au moment de la menstruation (74). Les désordres de cette partie de cycle sont responsables de dysménorrhées, provoquées par des contractions utérines trop importantes. Une voie de recherche originale sur le traitement de ces dysménorrhées est l'administration d'un dispositif transdermique de trinitrine. Une étude prospective randomisée en double aveugle a été débutée en Janvier 1997, dont les résultats ne nous sont pas encore communiqués (33).

C'est également par une modulation de la production du NO au moment de la menstruation, que l'hémostase se fait par contraction de l'utérus. En effet, la formation d'un clou plaquettaire provoquerait des synéchies, alors que l'action anti-aggrégante du NO permet d'éviter celles-ci (46).

II.2 : ROLE DU NO EN PHASE PREIMPLANTATOIRE

Pendant la phase précoce de la grossesse, les villosités choriales envahissent l'endomètre et les vaisseaux spiralés pour les transformer en vaisseaux à basse résistance.

Chez le cochon d'Inde, une étude histologique avait montré que le cytotrophoblaste exprimait une NOS autour des vaisseaux spiralés (43). Chez l'homme, cette étude histologique n'a pas permis de conclure à la présence de NOS dans le cytotrophoblaste (partie embryonnaire), mais bien au niveau du syncytiotrophoblaste (partie maternelle)(43). Les 9 échantillons obtenus par biopsies transcervicales entre 9 et 18 semaines puis au cours du 3^{ème} trimestre on peut-être été prélevés trop tard pour conclure à l'absence de contribution du NO à la placentation. On peut imaginer une NOS inductible présente juste le temps où le

II.3 : NO ET PREECLAMPSIE

De nombreux auteurs travaillent sur l'intérêt thérapeutique essentiel des donneurs de NO dans le traitement de la prééclampsie, mais les études sont difficiles à mener, d'une part en raison de la grande variabilité des patientes incluables, d'autre part parce qu'il s'agit souvent de patientes déjà traitées, soit par corticoïdes en raison du risque de prématurité, soit par différents antihypertenseurs et antiagrégants plaquettaires qui rendent difficile l'interprétation des dosages du NO ou de ses dérivés.

Une récente étude (52) a comparé chez des patientes pré-éclamptiques et des patientes normotendues les taux plasmatiques de nitrites à différents endroits au moment de la césarienne : dans une veine utérine drainant le lit placentaire, dans la veine ombilicale et dans la veine maternelle cubitale avant la délivrance placentaire. Les résultats montrent tous une augmentation significative des taux circulants de métabolites du NO chez les patientes prééclamptiques. De plus, il existe une corrélation négative avec le terme et le poids de naissance. Les auteurs concluent à un rôle compensateur d'une augmentation de la production de NO sur une vascularisation utérine insuffisamment compliante. Mais s'agit-il d'un phénomène secondaire ? Ne peut-il s'agir d'un phénomène préexistant à l'implantation et ayant entraîné une mauvaise placentation d'où une prééclampsie ? Ou d'un défaut de la NOS constitutive, entraînant un défaut de placentation que les NOS inductibles tentent de compenser ? Il serait sûrement intéressant pour notre compréhension de cette pathologie gravidique et pour son traitement (sa prévention ?) de pouvoir suivre une cohorte et de pouvoir procéder à un typage des NOS en cause.

II.4 : ROLE DU NO DANS LA GROSSESSE NORMALE

Comme il a été démontré que le NO modulait le tonus de base des vaisseaux normaux, et que la dénudation endothéliale de vaisseaux isolés entraînait une vasoconstriction (22), il est licite de spéculer que le NO maintient pendant la grossesse normale une relative quiétude de l'utérus. Les études réalisées chez le lapin et le singe macaque (39,65) ou chez l'homme (7,78,50), mettent en évidence une augmentation de la production de NO pendant la grossesse, et une augmentation de l'expression des NOS sur des fragments d'utérus obtenus pendant des césariennes. Cette augmentation de production de NO par rapport à un état non gravide ne se poursuit pas jusqu'à la fin de la grossesse puisqu'on observe alors une diminution de synthèse de NO. Ces résultats vont dans le sens des expériences de Yallampalli (79) qui montre sur des fragments d'utérus humains gravides une recrudescence de l'activité contractile spontanée par inhibition de la NOS par un inhibiteur spécifique. En revanche, une étude récente (16) qui a recherché par Réaction de Polymérisation en Chaîne inverse (rPCR) l'expression des NOS sur des fragments d'utérus prélevés pendant une césarienne dans trois groupes différents apporte des résultats contradictoires. En effet, cette étude met en évidence des taux d'acide ribonucléique messenger (ARNm) identiques dans les trois groupes suivants : un groupe césarisé avant terme et avant mise en travail, un groupe césarisé à terme avant mise en travail et un groupe césarisé à terme pendant le travail. Cependant, ces résultats sont à analyser avec prudence car cette étude permettait d'évaluer la présence de la NOS et non d'évaluer son activité. Peut-être la régulation de celle-ci varie-t-elle en fonction de la période de la grossesse. Une autre étude a démontré que la L-arginine et qu'un inhibiteur de la NOS n'avaient aucun effet sur des fibres utérines prélevées pendant une césarienne, en dehors de tout travail, à terme et avant terme ! (32)

La baisse de la synthèse de NO semble impliquée dans le déclenchement prématuré du travail. Une étude réalisée sur une cohorte de 10 patientes en menace d'accouchement

prématuré a montré une efficacité supérieure d'un traitement par de la L-arginine en perfusion versus la perfusion de sérum physiologique (18). Mais aucune étude randomisée n'a été faite en double-insue et l'on connaît les implications psychologiques de la menace d'accouchement prématuré. Lees et al (41) ont traité par dispositifs transdermiques de trinitrine 13 patientes en menace d'accouchement prématuré avec une efficacité appréciable pour des effets secondaires minimes. Mais aucune étude à grande échelle n'a, à ce jour, été menée avec des donneurs de NO de type dérivés nitrés, probablement du fait des lourds effets secondaires de ceux-ci, à type de céphalées et d'hypotension qui peut être néfaste sur le fœtus.

Il semblerait que l'action et le type de NOS soit différent selon le site utérin étudié. En effet, dans le col utérin, plusieurs auteurs ont mis en évidence une NOS inductible, dont l'expression serait augmentée au moment du travail, probablement pour permettre un relâchement de son tonus et une ouverture de celui-ci (16...).

Il semble en tout cas que le mécanisme d'action du NO puisse être différent selon la partie de l'utérus concernée (corps ou col) et selon le moment de la gestation. En effet, s'il a été décrit que les dérivés nitrés induisaient une augmentation de la production de GMPc dans l'utérus gravide (78), le rôle du GMPc sur la relaxation n'est pas parfaitement démontré (73). De plus, des analogues stables du GMPc ne reproduisent pas la relaxation obtenue par les donneurs de NO (6). D'autres auteurs enfin ne trouvent de rôle direct à l'augmentation du GMPc que dans certaines parties de l'utérus (le col en l'occurrence) (16,39).

En obstétrique, le seul usage des dérivés nitrés est celui du Lénital® (trinitrine) par voie intra-veineuse lors des rétractions du col sur tête dernière ou sur 2^{ème} jumeau. Son usage tend à se généraliser lors d'hypertonies survenant pendant le travail. L'efficacité clinique est remarquable. Le dérivé nitré se substituerait-il avantageusement à une production insuffisante de NO par les NOSi à ce moment-là ?

CHAPITRE 4 : PARTIE EXPERIMENTALE

I : OBJECTIFS

Comme nous venons de le présenter dans la première partie de ce travail, le NO et les dérivés nitrés peuvent avoir des indications dans le domaine de la gynécologie obstétrique.

Une étude multicentrique, dont le CHU de Grenoble fait partie, est actuellement en cours en France concernant l'usage d'un donneur de NO (trinitrine en patch) en période préimplantatoire et implantatoire chez les patientes bénéficiant d'une FIV. Le rapport entre la vascularisation utérine et la réceptivité endométriale est maintenant bien démontré (71) et la trinitrine est connue pour ses effets vasodilatateurs. De plus, il a été également prouvé que le taux d'implantation était significativement plus élevé chez les patientes qui présentaient moins de contractions utérines au moment du transfert embryonnaire. La trinitrine est de ce fait une thérapeutique adjuvante doublement séduisante. Mais les effets secondaires d'un tel traitement sont lourds. La physiologie de la contractilité utérine sur l'utérus humain non gravide est encore plus mal connue que pendant la grossesse et le mode d'action du NO dans cette indication est mal compris (10).

Nous avons, par un travail expérimental, voulu répondre à plusieurs questions.

- Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier que le NO avait bien un effet relaxant sur le myomètre humain non gravide. Pour cela, nous avons utilisé un donneur de NO, le SNP, et testé son action sur la contractilité utérine spontanée..

- dans un deuxième temps, nous avons voulu étudier l'existence dans l'utérus humain non gravide d'un éventuel système de synthèse de NO par le myomètre. Nos expériences ont alors testé l'effet du précurseur du NO, la L-arginine, sur la contractilité spontanée utérine.

- Enfin, en raison des résultats contradictoires décrits dans la littérature concernant le mode d'action du NO sur le muscle lisse utérin et l'implication éventuelle du GMPc produit, nous avons testé les effets de la L-arginine et du SNP en présence de bleu de méthylène, inhibiteur reconnu de la guanylate cyclase.

Pour finir, nous avons étudié l'effet d'un analogue stable du GMPc, le 8-Bromo-GMPc sur les contractions utérines spontanées.

Ce travail rapporte les résultats des expériences que nous avons réalisées dans le laboratoire de pharmacologie du Pr Bessard à la Faculté de Médecine de Grenoble.

II : MATERIEL ET METHODES

II.1 : ORIGINE DES PRELEVEMENTS

Les expériences ont été réalisées sur des échantillons d'utérus humains non gravides. Les prélèvements étaient effectués lors d'hystérectomies pour pathologies bénignes, il s'agissait dans tous les cas d'utérus fibro-myomateux envoyés en anatomopathologie pour analyse. Les patientes avaient parfois bénéficié dans les mois précédents d'un traitement par progestatifs. Le traitement avait toujours été arrêté depuis au moins deux mois. Les indications de ces hystérectomies étaient toutes "ménométrorragies invalidantes". Les prélèvements ont été effectués du 01/02/99 au 10/09/99. Au total nous avons prélevé des fragments de 18 utérus.

Après avoir disséqué le fascia pré-utérin, nous avons prélevé un rectangle d'environ 1,50 cm x 2,00 cm x 0,25 cm sur le faisceau de Calza (voir chapitre 1).

Ce fragment était immédiatement immergé dans un flacon rempli de solution physiologique de Krebs maintenu à 4°C. Acheminé dans les plus brefs délais dans le laboratoire de pharmacologie afin de ne pas rompre la chaîne du froid, le fragment était alors découpé en bandelettes de 0,25 x 0,25 x 1,50 cm. Les fibres musculaires dans les bandelettes avaient donc une orientation préférentiellement verticale d'après les descriptions anatomiques classiques.

II.2 : PREPARATION DES TISSUS

Chacune des bandelettes était alors montée entre 2 nœuds afin de pouvoir être placée entre 2 étriers pour être mise en tension dans une cuve à organe isolée.

Les prélèvements étaient utilisés dans les 24 heures qui suivaient leur préparation. Quand ils n'étaient pas utilisés immédiatement, ils étaient conservés à 4°C dans une solution de conservation d'organes bullé par du carbogène (95 % O₂/5% CO₂) pendant 15 minutes.

Afin de tenter d'améliorer la conservation des prélèvements, nous avons testé différents milieux nutritifs, dont le milieu de Krebs-Hépès qui a été décrit comme assurant une bonne conservation de la réactivité des vaisseaux isolés (67). Cependant, ce milieu n'a pas semblé adéquat pour la conservation des utérus humains, car il nous a été impossible d'obtenir des contractions sur des utérus ayant été conservés dans du Krebs-Hépès (observations personnelles).

Cette observation va dans le sens des résultats de Kilarski et al (36), qui ont constaté une diminution importante du nombre de jonctions gap au fur et à mesure que la durée de conservation de fragments d'utérus humains gravides dans du milieu Hépès augmentait (36).

Nous avons donc finalement conservé les prélèvements utérins dans de la solution physiologique de Krebs, dont la composition suit :

Composition du milieu :

NaCl :	7.30 g/l	(118 mM)
KCl :	0.18 g/l	(4,7 mM)
CaCl ₂ :	0.20 g/l	(2,5 mM)
KH ₂ PO ₄	0.14 g/l	(1.0 mM)
MgSO ₄ :	0.10 g/l	(1,0 mM)
NaHCO ₃	2 g/l	(25 mM)
D-glucose :	1.98 g/l	(11.0 mM).

Ces éléments étaient ajoutés successivement dans l'eau distillée. Un mélange vigoureux permettait une solubilisation totale des différents éléments. Le pH était contrôlé entre 7,35 et 7,45.

II.3 : DESCRIPTION DES CUVES A ORGANE ISOLE

Nous avons travaillé sur un banc de cuves à organe isolé permettant d'étudier plusieurs bandelettes utérines simultanément. A chaque bandelette correspondait une cuve à organe isolée, un capteur de tension et enregistreur. Chaque bandelette est montée selon le même modèle (figure 13).

La cuve, préalablement rincée trois fois à l'eau distillée, était remplie de 8 ml de solution physiologique de Krebs et immergée dans un bain-marie qui la maintenait à 37°C par un circuit hydraulique thermostaté. La cuve était vidangeable par le fond. Un fin tuyau d'oxygénation était placé dans la cuve et maintenu de façon à ne pas perturber l'enregistrement. Le bullage était réalisé avec du carbogène dont le débit était réglé à environ 100 bulles par minutes.

Les bandelettes étaient placées dans chaque cuve entre 2 étriers métalliques. La hauteur du 2^{ème} étrier était réglable, et c'est par son intermédiaire qu'était réglée la tension appliquée à la bandelette utérine. La tension isométrique développée par les bandelettes utérines a été mesurée à l'aide de jauges de contraintes (UF-1 Pioden) et d'amplificateurs (EMKA, Palmer France) reliés à des enregistreurs Sefram (France).

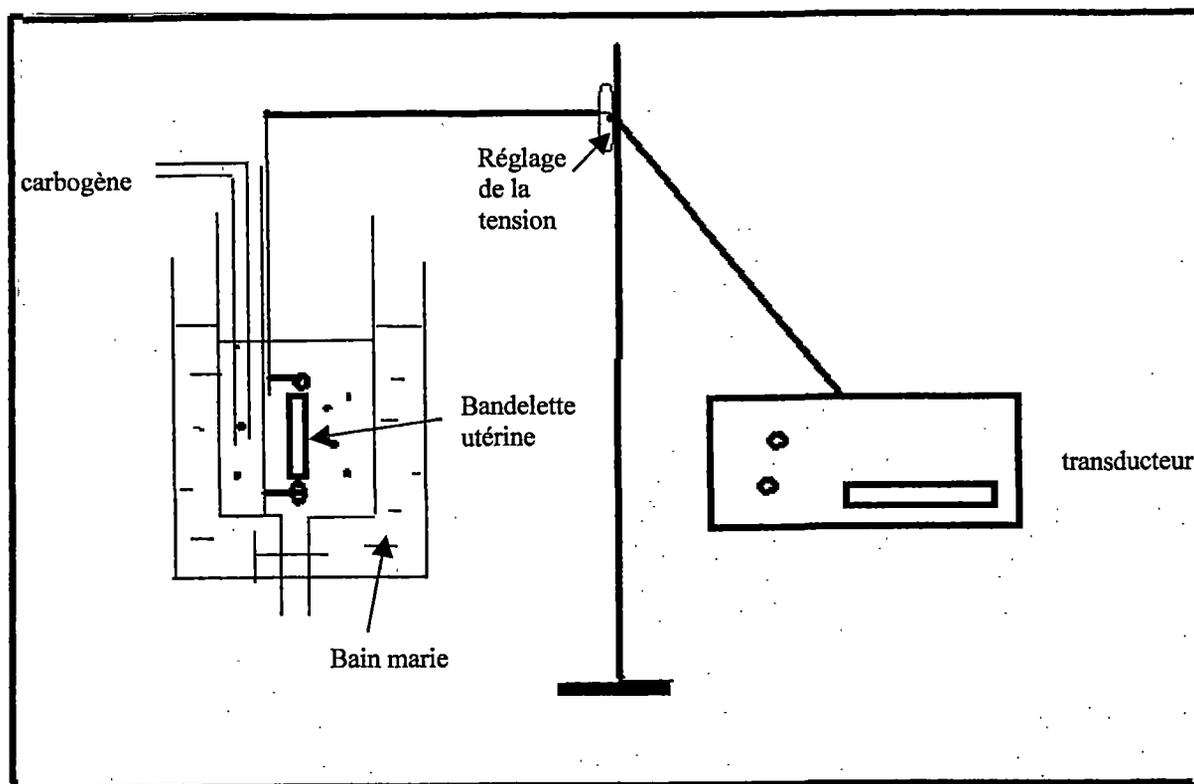


Figure 13 : montage d'une bandelette utérine dans une cuve à organe isolé

II.4 : MISE EN TENSION DES BANDETTES D'UTERUS

Les auteurs ayant travaillé sur des fragments d'utérus humain en cuve à organe isolé ont appliqué une tension passive sur la bandelette allant de 0,5 (37) à 1,25g (6,7) puis ont laissé aux bandelettes une période de stabilisation allant de 1 à 2 heures pour permettre à l'activité utérine de se régulariser. Bradley et al (6), dans des expériences préliminaires, ont établi qu'il fallait appliquer une force en gramme correspondant à 1,5 fois la longueur de repos en centimètre. Nos bandelettes mesurant 1,5 cm de long, nous leur avons donc imposé une force de 2 g. Après cette procédure de mise en tension passive des bandelettes utérines suivait une période de stabilisation de 1 heure, avec des rinçages de la solution de Krebs toutes les 15 minutes. A la fin de cette période de stabilisation, du KCl 90 mM était ajouté de façon à obtenir une dépolarisation maximale. Enfin, une nouvelle période de stabilisation de 2 heures était imposée aux utérus, avec rinçage de la solution de Krebs tous les quarts d'heure.

III : PROTOCOLE

Ont été incluses dans le protocole toutes les bandelettes qui présentaient après l'addition de KCl et rinçage par la solution physiologique de Krebs pendant 2 heures une activité contractile régulière pendant au moins 30 minutes.

Lors de chaque série de manipulations, nous avons enregistré une bandelette en continu pour vérifier que la contractilité ne s'épuisait pas spontanément par effet temps. Chaque série d'expériences correspond à un utérus et représente le plus souvent 5 bandelettes.

Nous inspirant de Kuenzli et al (38) et de Yallampalli et al (78), nous avons réalisé sur les bandelettes sélectionnées un ajout de produit (SNP ou L-arginine) à concentration croissante de log en log toutes les 10 minutes. La période de 10 minutes précédant le premier ajout de produit servait de témoin. Un seul agent relaxant a été testé sur chaque bandelette utérine.

III.1 : COURBE CONCENTRATION/REPONSE A LA L-ARGININE AVEC OU SANS BLEU DE METHYLENE

Après la période de stabilisation, les bandelettes ont été prétraitées par du bleu de méthylène (10^{-5} M) ou son solvant (contrôle) pendant 30 minutes au terme desquelles de la L-arginine a été ajoutée toutes les 10 minutes de façon cumulative, de la concentration 10^{-6} à 10^{-3} M. Ces doses ont été déterminées par des manipulations préliminaires (données non montrées), car aux doses plus faibles nous n'obtenions aucun effet.

Du fait de la photosensibilité du bleu de méthylène, les expériences ont été réalisées à l'abri de la lumière, les cuves étaient protégées par du papier d'aluminium.

III.2 : COURBE CONCENTRATION/REPONSE AU SNP AVEC OU SANS BLEU DE METHYLENE

De la même façon, nous avons exposé des bandelettes utérines à des concentrations croissantes cumulées de SNP de 10^{-8} à 10^{-3} M.

Comme pour les expériences avec la L-arginine, nous avons chaque fois que possible étudié l'effet du SNP sur les bandelettes utérines incubées avec du bleu de méthylène 10^{-5} M ou son solvant (contrôle) à l'abri de la lumière.

III.3 : ETUDE DE L'EFFET DU 8-BROMO-GMPC

Nous avons exposé des bandelettes utérines se contractant régulièrement à des concentrations croissantes de 8-Bromo-GMPC de façon cumulative de la dose 10^{-8} M à la dose 10^{-3} M.

III.4 : CRITERES DE JUGEMENT

Nous avons pris comme critères de jugement l'amplitude des contractions, en grammes, dont le relevé a été fait manuellement sur les graphes, ainsi que la fréquence des contractions, relevée elle aussi manuellement.

Les produits ont été affectés au hasard des bandelettes, bien qu'une table de permutation ait été plus rigoureuse pour s'affranchir de toute subjectivité (mea culpa...).

III.5 : EXPRESSION DES RESULTATS ET ANALYSE STATISTIQUE

Pour chaque bandelette, nous avons calculé l'amplitude moyenne et la fréquence pendant les 10 minutes où elle était soumise à une nouvelle concentration d'agent relaxant .

Les fréquences ont été exprimées en nombre de contractions/heure. La moyenne des amplitudes de la contraction pour une concentration donnée d'agent relaxant était rapportée à la moyenne des amplitudes avant tout ajout de produit (témoin interne), ce qui nous a permis de construire des courbes concentration/pourcentage d'inhibition.

Les résultats exprimés sont les moyennes \pm les écarts types de la moyenne. Pour chaque courbe concentration-inhibition, l' EC_{50} (concentration qui provoque une inhibition de 50 %) et le E_{max} (% d'inhibition maximale) ont été déterminés par un logiciel de statistique (Statview). La valeur de pD_2 représente la puissance de l'agent relaxant testé et correspond à $-\log(EC_{50})$, alors que la valeur de E_{max} représente l'efficacité de l'agent relaxant.

L'analyse statistique de la comparaison des différentes courbes obtenues a été réalisée par une analyse de variance suivie d'un test de Bonferroni pour des comparaisons multiples.

Pour les expériences réalisées avec le 8-Bromo-GMPc nous avons comparé entre elles les moyennes des amplitudes et les fréquences des contractions obtenues à chaque concentration par une analyse de variance.

III.6 : PRODUITS ET REACTIFS

Les produits utilisés et leur provenance ont été : la L-arginine, le SNP, le Bleu de méthylène, le 8 bromo GMPc et l'Hépès de Sigma (L'isle D'Abeau, France). La solution de Krebs a été préparée avec des produits Prolabo Normapur (Paris, France).

IV : RESULTATS GENERAUX

IV.1 : DESCRIPTION DE LA POPULATION

Nous avons pu analyser des bandelettes utérines provenant de 11 patientes, soit 8 séries de 5 bandelettes pour l'étude de la réactivité à la L-arginine et au SNP et 3 séries de 3 bandelettes pour le 8-bromo-GMPc.

Sur les 18 prélèvements effectués au départ, 7 n'ont pas pu être inclus par absence d'activité régulière : 3 conservés dans de la solution physiologique de krebs-Hépès, et 4 autres pour des raisons inconnues. Enfin, 9 bandelettes sur les 8 premières séries analysées, soit 9/40, n'ont pu être incluses.

L'âge moyen des patientes ayant participé à l'étude était de 49 ans et 4 mois \pm 3 ans et 6 mois, avec des extrêmes de 47 ans à 52 ans et 3 mois.

La parité moyenne était de 2, avec des extrêmes de 0 à 4.

Toutes les patientes étaient encore réglées, mais de façon irrégulière. Elles présentaient toutes des ménométrorragies invalidantes. La date d'intervention était généralement fixée en 1^{ère} partie de cycle, mais il s'avérait souvent que l'on ne pouvait plus repérer le cycle normal...

IV.2 : DESCRIPTION DES BANDELETTES

Les bandelettes étaient toutes pesées en fin de manipulation sur une balance de précision. En effet, après immersion dans le milieu de Krebs, elles se recroquevillaient parfois, c'est pourquoi nous avons utilisé leur poids plutôt que leur taille pour vérifier que notre population était homogène.

Le poids moyen des bandelettes était de 172 ± 37 mg, avec des extrêmes de 126 à 223 mg.

IV.3 : ETUDE DES VARIATIONS DE LA CONTRACTILITE UTERINE EN FONCTION DU TEMPS

Chaque fois que nous avons obtenu suffisamment de bandelettes qui contractaient régulièrement, nous avons laissé contracter une bandelette témoin pendant toute la durée des expériences. L'influence du facteur temps sur la contractilité utérine a été étudiée sur 6 bandelettes utérines provenant de 6 patientes différentes.

Nous avons mesuré l'amplitude moyenne des contractions et leur fréquence sur 3 périodes de 10 minutes, l'une correspondant à la période témoin des autres bandelettes (T1) soit de t -10 mn à t 0, l'autre en milieu de manipulation (T2) soit t 20 mn à t 30 mn, la dernière dans les 10 dernières minutes de manipulation (T3) soit t 50 mn à 60 mn. t 0 correspond à l'ajout de la première concentration

Le tableau 1 donne les valeurs moyennes \pm écarts types de la moyenne de l'amplitude des contractions utérines au cours de ces 3 périodes :

	Moyenne (g)	Ecart type de la moyenne (DS)
T1	2,75	0,99
T2	2,85	1,05
T3	3	1,16

Tableau 1 : moyennes des amplitudes des contractions utérines en fonction du temps (n = 6), pour chaque période de 10 minutes en début, milieu et fin de manipulation.

D'après le tableau 1, une analyse de variance montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les moyennes des amplitudes. On peut donc considérer que le temps n'épuise pas l'amplitude des contractions.

Le tableau 2 donne les valeurs moyennes \pm écarts types de la moyenne de la fréquence des contractions utérines au cours de ces 3 périodes :

	Fréquence/heure	Ecart type de la moyenne (DS)
T1	12	2.4
T2	12,2	2.56
T3	12,8	1.28

Tableau 2 : moyenne des fréquences des contractions utérines en fonction du temps (n = 6) à chaque période de 10 minutes en début, milieu et fin de manipulation.

D'après le tableau 2, le test F ne met en évidence aucune différence des moyennes entre les 3 périodes.

Le temps n'altère pas la fréquence des contractions spontanées de l'utérus dans nos conditions d'expérience.

IV.4 : COMPARAISON DE LA CONTRACTILITE DES BANDETTES UTERINES AVANT ET APRES APPLICATION DE BLEU DE METHYLENE

Le tableau 3 présente les moyennes des amplitudes et des fréquences des 13 bandelettes qui ont été traitées par du bleu de méthylène. Nous avons relevé les fréquences et amplitudes de chaque bandelette dans les 10 minutes précédant l'ajout du bleu de méthylène (Avant BM), et de la 20^{ème} à la 30^{ème} minute suivant l'ajout du bleu de méthylène (après BM), juste avant l'ajout d'un des deux agents relaxants que nous avons voulu tester.

	Avant BM	Après BM	Ecart moyen	DDL	p
Amplitudes moyennes (g)	3.53	3.27	0.389	12	0.63
Fréquences moyennes(/h)	13.3	12.9	0.026	12	0.86

Tableau 3 : comparaison des moyennes des amplitudes et des fréquences avant et après traitement par bleu de méthylène (n=13).

Il n'y a aucune différence significative des amplitudes et des fréquences des contractions utérines avant ou après pré-traitement par le bleu de méthylène.

V : EFFET DU SNP SUR LA CONTRACTILITE UTERINE

La figure 14 montre un exemple d'enregistrement d'une bandelette traitée par le SNP.

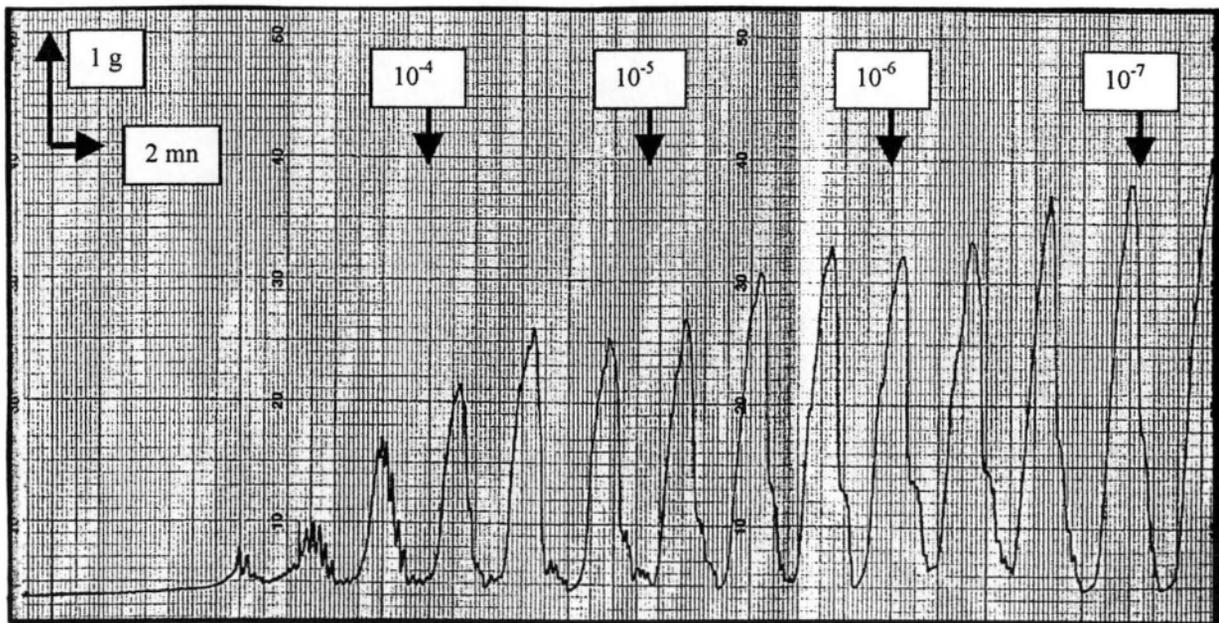


Figure 14 variation de la contractilité utérine en réponse à l'addition de concentrations croissantes de SNP.

L'addition de SNP induit une inhibition significative concentration-dépendante de l'amplitude de la contractilité utérine (figure 15, tableau 4).

En revanche, seul le SNP à partir de la concentration 10^{-5} M entraîne une diminution significative de la fréquence de la contractilité utérine (fréquence témoin = $15,6 \pm 2,50$ versus fréquence 10^{-5} M = $3,6 \pm 1,47$, $p < 0,05$).

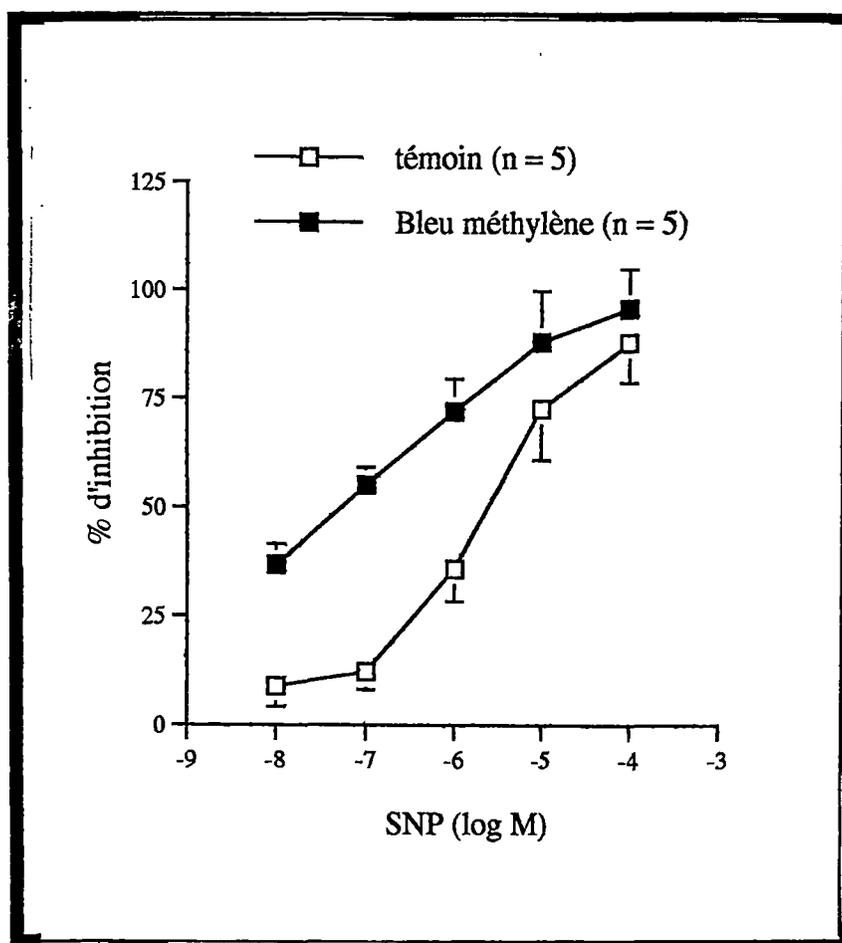


Figure 15 : courbe concentration/réponse au SNP sur des prélèvements d'utérus humains non gravides en présence ou absence (témoin) de bleu de méthylène. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la contraction initiale. Les barres verticales représentent les erreurs standards de la moyenne. n représente le nombre de bandelettes provenant chacune d'un utérus différent.

Le pré-traitement par le bleu de méthylène entraîne une potentialisation significative de la puissance du SNP sur le muscle lisse utérin (figure 15, tableau 4), mais n'en modifie pas significativement l'efficacité.

	pD2	E _{max}
SNP	5.65 +/- 0.18	87.80 +/- 9.29
SNP+Bleu méthylène	6.95* +/- 0.36	95.71** +/- 4.28

Tableau 4 : puissance et efficacité du SNP en présence ou absence de bleu de méthylène 10^{-5} M. Les résultats présentés sont les résultats moyens de 5 expériences +/- erreurs standards de la moyenne. * p=0.01 ** p=0.36

VI : EFFET DE LA L-ARGININE SUR LA CONTRACTILITE UTERINE

La figure 16 représente un exemple de bandelette soumise à la L-arginine.

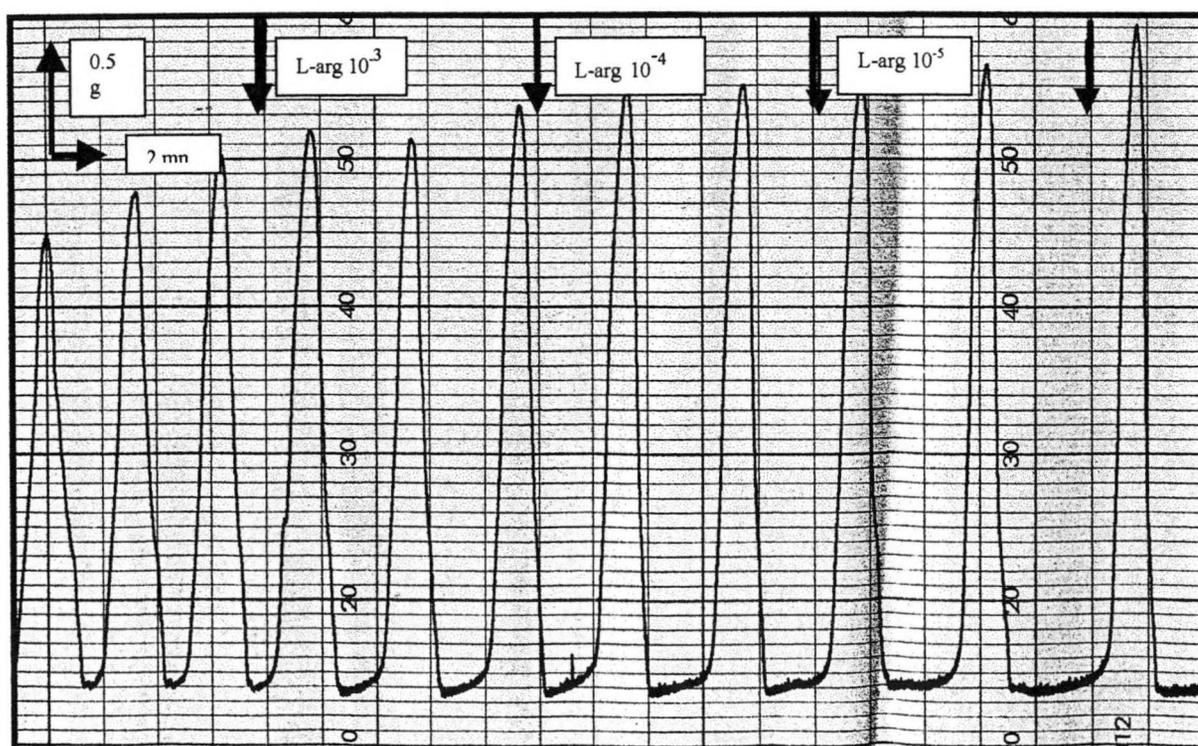


Figure 16 : variation de la contractilité utérine en réponse à des concentrations croissantes de L-arginine.

L'addition de L-arginine entraîne une inhibition concentration dépendante de l'amplitude de la contraction utérine (figure 17, tableau 5).

En revanche, comme on le constate sur la figure 13, la fréquence est peu affectée par la L-arginine. Seule la L-arginine à 10^{-3} M entraîne une différence significative de la fréquence par rapport à la période témoin (fréquence témoin = $13,80 \pm 2,12$ versus fréquence $10^{-3} = 6,80 \pm 1,85$).

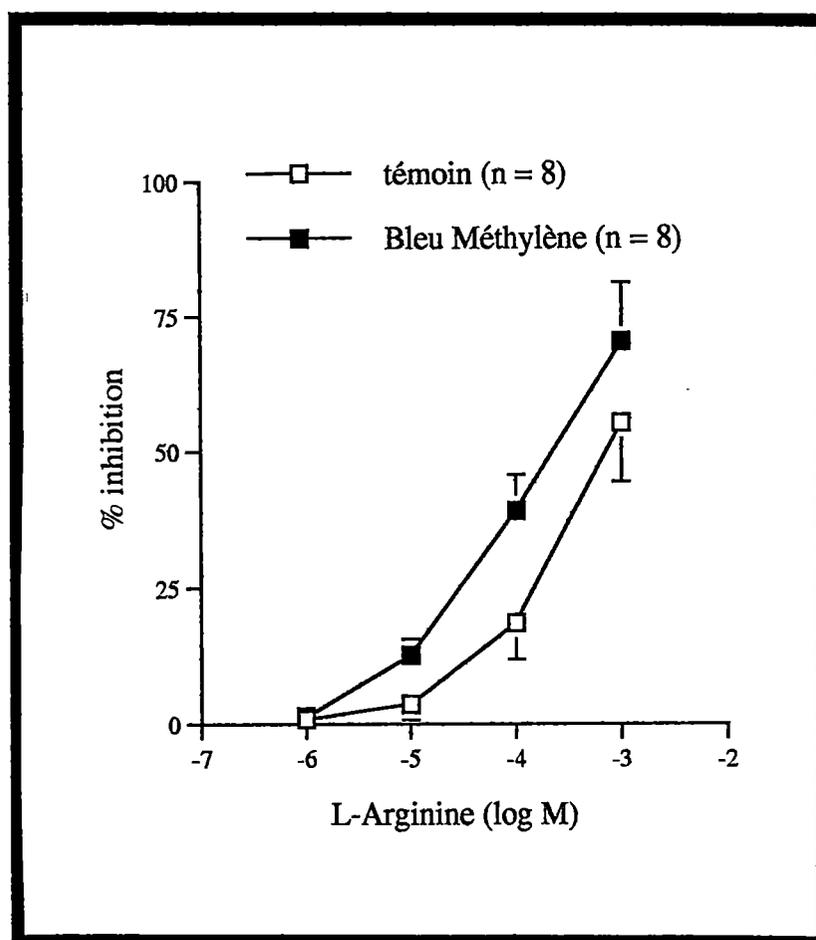


Figure 17 : courbes concentration/réponse à la L-arginine, en présence ou absence (témoin) de bleu de méthylène sur des prélèvements d'utérus humains non gravides. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la contraction initiale. Les barres verticales représentent les écarts types de la moyenne. n représente le nombre de bandelettes provenant chacune d'un utérus différent.

Le pré-traitement par le bleu de méthylène tend à potentialiser l'efficacité et la puissance de la L-arginine sur le muscle lisse utérin (figure 17, tableau 5), bien que cette potentialisation ne soit pas significative (tableau 5).

	pD ₂	E _{max}
L-arginine	3.65 +/- 0.15	55.28 +/- 10.85
L-arginine+Bleu méthylène	4.01 +/- 0.22*	70.25 +/- 11.58**

Tableau 5 : puissance et efficacité de la L-arginine en la présence ou l'absence de bleu de méthylène 10⁻⁵ M. Les résultats présentés sont les résultats moyens +/- erreurs standards de la moyenne de 8 expériences réalisées en parallèle sur 1 bandelette et son témoin provenant du même utérus. * p=0.22, ** p=0.35

VIII : EFFET DU 8-BROMO-GMP_c SUR LA CONTRACTILITE UTERINE

La figure 18 montre un exemple de la stabilité de la contractilité utérine des bandelettes utérines soumises au 8-bromo-GMP_c.

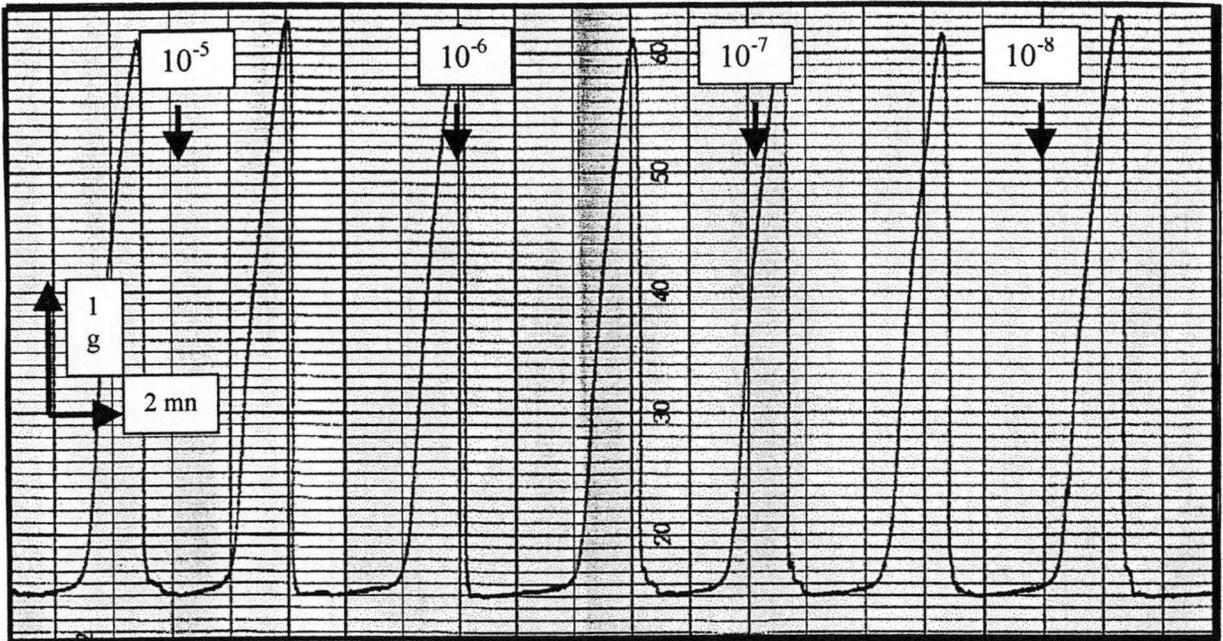


Figure 18 : exemple d'enregistrement de la stabilité de la contraction utérine sous l'action du 8-bromo-GMPc à des concentrations croissantes.

L'addition de 8-bromo-GMPc n'a pas modifié la contractilité utérine spontanée. Nous avons comparé les moyennes des amplitudes et des fréquences pour chaque concentration de 8-bromo-GMPc à la moyenne témoin avant tout ajout de 8-bromo-GMPc. Une analyse de variance montre qu'il n'y a pas de différence significative des fréquences ou des amplitudes entre elles. Le tableau 6 donne les moyennes d'amplitude et de fréquences pour les 7 bandelettes provenant de 3 utérus qui ont été testés, et ce pour chaque concentration.

8-bromo-GMPc	témoin	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	moyenne
Amplitude (g)	2.73 +/- 1.64	2.78 +/- 1.70	2.80 +/- 1.91	2.66 +/- 1.60	2.68 +/- 1.62	2.76 +/- 1.65	2.62 +/- 1.48	2.71 +/- 0.06
Fréquence (/h)	17.00 +/- 3.51	14.33 +/- 2.76	17.50 +/- 3.41	17.00 +/- 3.52	16.50 +/- 2.76	15.66 +/- 3.12	14.33 +/- 2.96	16 +/- 0.11

Tableau 6 : stabilité de la contractilité en amplitude et en fréquence sous 8-bromo-GMPc. Les résultats sont donnés en moyenne des amplitudes et des fréquences à une concentration donnée +/- erreur standard de la moyenne.

DISCUSSION

Les expériences réalisées dans cette thèse montrent qu'un précurseur de la synthèse du NO tel que la L-arginine et qu'un donneur de NO tel que le SNP entraînent *in vitro* une inhibition de la contractilité spontanée des utérus humains non gravides.

Il est important d'insister sur la difficulté que nous avons eu à travailler sur des tissus humains, en raison des contraintes de transport et de planification rencontrées. De plus, le statut hormonal des utérus dont nous disposions n'étaient pas superposable au statut des patientes stimulées en FIV. Les dernières étant effectivement en hyper-oestrogénémie au moment du transfert embryonnaire, alors que le statut hormonal des patientes incluses dans l'étude était variable (13). Or, il est maintenant reconnu que l'expression myométriale des NOSynthases est sous dépendance des hormones sexuelles. Il semble que les oestrogènes régulent l'expression des NOSe myométriales, et que la progestérone sensibilise les fibres utérines au NO (35,21). De plus, la régulation transcriptionnelle du gène Cx-43, codant pour les jonctions gap, est sous la dépendance des oestrogènes (42). Un état d'hypo-oestrogénémie pourrait peut-être expliquer pourquoi sur certains utérus, nous n'avons jamais réussi à obtenir de contractions régulières. A cet effet, il serait intéressant de connaître dans les expériences ultérieures le statut hormonal des patientes – au moins leur oestradiolémie au moment du prélèvement – pour évaluer la réactivité utérine en fonction du statut hormonal.

Enfin, la contractilité de l'utérus non gravide est plus aléatoire que celle de l'utérus gravide. En effet, nous n'avons jamais obtenu de contractions régulières spontanées sur ces utérus non gravides préménopausiques par l'effet d'une simple force passive. De même, nous n'avons pu obtenir de contractions régulières sur la totalité des fragments montés, malgré un traitement identique pour toutes les bandelettes. Certains utérus n'ont même présenté que quelques contractions en début de manipulation, épuisées très rapidement et sur ces échantillons-là aucun agent ocytocique n'a pu "réveiller" l'activité utérine.

Nous avons choisi d'analyser l'effet d'agents relaxants sur la fréquence et l'amplitude des contractions utérines. Ce sont ces deux paramètres qui sont analysés en clinique pour le suivi d'un travail. Sur le plan théorique il semble que ces deux critères soient le reflet de la contraction utérine : l'amplitude de la contraction, reflétant la coopération intercellulaire, probablement régulée par les jonctions gap (24), la fréquence, reflétant l'activité des cellules "pace-maker". Il aurait été optimal de pouvoir calculer l'aire sous la courbe pour analyser la totalité des paramètres de la contraction, mais le laboratoire ne disposait pas des moyens permettant de le faire automatiquement.

Les expériences réalisées avec le SNP mettent en évidence une diminution de la contractilité de l'utérus humain non gravide. Ces résultats sont en accord avec les études réalisées sur le rat (34) le cochon d'inde (38), et le singe macaque (39).

De façon surprenante, le prétraitement par le bleu de méthylène 10^{-5} M entraîne une potentialisation de l'effet inhibiteur du SNP et une tendance à la potentialisation de l'effet inhibiteur de la L-arginine. Or, il est bien établi sur le muscle lisse vasculaire que le SNP ou la L-arginine entraînent une augmentation du taux de GMPc conduisant à la relaxation (46) et que le traitement par le bleu de méthylène inhibe la relaxation GMPc dépendante.

Sur le muscle lisse utérin a été décrit que le SNP ou la L-arginine produisait une augmentation du taux de GMPc (39,27,38) chez l'animal gravide, mais également sur l'utérus humain non gravide (6). Cependant, ces mêmes études, montraient que le pré-traitement par le bleu de méthylène n'inhibait pas la relaxation concentration dépendante induite par la L-arginine ou le SNP, même si le taux de GMPc était bien effondré.

Aucune publication ne fait état à ce jour d'un effet potentialisant du bleu de méthylène sur l'inhibition de la contractilité utérine spontanée en réponse au SNP. Il semble même qu'avec un plus grand nombre de manipulations nous aurions également montré une potentialisation significative de l'action de la L-arginine en présence de bleu de méthylène. En effet, la plus grande variabilité des résultats obtenus avec la L-arginine peut s'expliquer par la nécessité d'une biotransformation enzymatique de la L-arginine par la NOS, dont l'expression et l'activité sont sujettes à une variabilité inter-individuelle.

Les résultats concernant le rôle du GMPc sur la relaxation utérine sont sujet à controverse car plusieurs auteurs (78,51) ont montré que le 8-bromo-GMPc, analogue stable du GMPc, produisait une relaxation concentration dépendante de la contractilité utérine. Cependant toutes ces études étaient menées sur utérus gravides : celle de Norman et al (51) concernait des fragments d'utérus humains non en travail et celle de Yallampalli et al (78) des fragments d'utérus de rats, en travail ou pas.

Nos expériences concernant l'influence du 8-bromo-GMPc sur la contractilité utérine ne mettent en évidence aucune action de celui-ci sur myomètre humain non gravide. Il semble donc bien que le 8-bromo-GMPc ne soit pas impliqué dans l'effet relaxant du SNP et de la L-arginine sur utérus humain non gravide.

Si le GMPc n'est pas impliqué dans l'effet relaxant produit par le SNP et la L-arginine, ces derniers agissent via d'autres mécanismes. Une étude (3) réalisée sur des lignées cellulaires utérines immortalisées mettait en évidence un probable rôle des canaux potassiques dans la modulation de la contractilité myométriale. Une autre étude (47), réalisée sur des fragments d'utérus humains gravides, mettait en évidence une action relaxante de deux activateurs des canaux potassiques, action inhibée par le glibenclamide, un bloqueur des canaux potassiques ATP dépendants. Plus récemment, l'étude de Modzelewska et al (45) a montré sur utérus humain non gravide, que l'action relaxante concentration dépendante d'un

donneur de NO était inhibée par le glibenclamide, et pas par le bleu de méthylène. Il semble donc ainsi que, sur utérus humain non gravide, l'action relaxante médiée *in vitro* par le NO passe par la mise en jeu des canaux potassiques ATP ou calcium dépendants (3). Par ailleurs, outre son effet inhibiteur de la guanylate cyclase, le bleu de méthylène a été décrit comme étant un activateur des canaux potassiques calcium-dépendants à large conductance (5). Ceci pourrait expliquer en partie la potentialisation de l'inhibition de la contraction spontanée utérine. De plus, l'inhibition de la guanylate cyclase par le bleu de méthylène pourrait réorienter le NO vers l'activation des canaux potassiques (69).

Quoi qu'il en soit, la voie de transduction du signal du NO semble ainsi différente dans le muscle lisse vasculaire et le muscle lisse utérin.

Les expériences avec la L-arginine, précurseur reconnu de la synthèse de NO (46), montrent qu'il existe une inhibition de l'amplitude des contractions spontanées utérines. Ces résultats constituent la première démonstration sur utérus humain non gravide d'un effet relaxant de la L-arginine. De plus, ces données suggèrent d'un point de vue fonctionnel la présence d'une NOSynthase dans le myomètre humain non gravide et vont dans le sens d'études précédentes réalisées par immunohistochimie (35,72) et ayant mis en évidence l'expression de Nosynthases dans du myomètre non gravide et parfois préménopausique. Il semble donc que le myomètre puisse jouer un rôle préventif sur l'apparition des contractions sur utérus non gravide. L'existence d'une NOSynthase fonctionnelle sur le muscle lisse utérin non gravide sera confirmé dans des expériences ultérieures où nous testerons l'effet d'un inhibiteur de la NOS (la L-NAME) sur l'inhibition de la contractilité utérine induite par la L-arginine.

Ces résultats sont en accord avec les études réalisés sur utérus humain gravide montrant :

- un effet relaxant de la L-arginine et

- une augmentation de la production de NO après addition de L-arginine (7,17,31).

Les effets inhibiteurs obtenus avec la L-arginine sont observés pour des concentrations *in vitro* élevées. Peut-on envisager une application clinique ? La voie buccale semble difficile à proposer du fait de doses trop importantes à ingérer. Peut-être pouvons nous envisager une administration par voie vaginale de L-arginine ? Fanchin et al (19) ont montré que la progestérone administrée par voie vaginale avait le même effet sur la muqueuse utérine qu'administrée per os, malgré des taux plasmatiques significativement plus bas. Ils suggèrent qu'il pourrait exister un passage direct dans l'utérus, ou "effet de premier passage utérin". Pouvons-nous envisager un traitement de L-arginine par un dispositif intravaginal après remplacement embryonnaire dans le cadre de la FIV ? Les effets secondaires devraient être moindres qu'avec les dispositifs transdermiques de trinitrine.

L'utilisation du SNP semble non envisageable dans le cadre de la procréation médicalement assistée, par absence de données sur la grossesse et sa trop puissante action hypotensive principalement. Pour les mêmes raisons l'utilisation des activateurs des canaux potassiques n'est pas encore envisageable en gynécologie-obstétrique et de nombreuses études *in vitro* et chez l'animal sont d'abord nécessaires.

Les perspectives de ce travail sont multiples.

D'une part, des expériences supplémentaires permettront de confirmer la tendance à la potentialisation par le bleu de méthylène de l'action de la L-arginine.

Ensuite, il sera intéressant d'étudier l'implication des différents canaux potassiques dans l'inhibition de la contractilité utérine spontanée induite par les donneurs de NO, *in vitro* sur utérus non gravides, puis, si l'expérience est concluante, sur utérus gravides...

Enfin, cliniquement, étudier lors d'une FIV l'influence de l'administration de trinitrine sur la contractilité utérine spontanée par échographie transvaginale couplée à l'analyse informatique de l'image (logiciel IôDP), afin de savoir si l'action de la trinitrine sur le taux d'implantation n'est pas surtout en rapport avec une diminution des contractions au moment du transfert.

Nous pouvons également rêver et imaginer participer à une étude clinique concernant l'efficacité d'un dispositif intravaginal de ... L-arginine.

THESE SOUTENUE PAR : Pascale HOFFMANN

**EFFET DE LA L-ARGININE ET DU NITROPRUSSATE DE SODIUM SUR LA
CONTRACTILITE UTERINE**

Etude *in vitro* sur myomètre humain non gravide

CONCLUSIONS

Le monoxyde d'azote (NO) et les dérivés nitrés sont identifiés depuis plus de vingt ans comme étant de puissants facteurs relaxants du muscle lisse vasculaire, via une augmentation du taux de GMPc.

Ils sont également connus pour leur effet relaxant sur le muscle lisse utérin gravide depuis plus de dix ans.

Moins connus sont leurs effets sur le myomètre humain non gravide. Y existe-t-il une NOSynthase fonctionnelle ? Le NO et les dérivés nitrés y ont-ils une action relaxante ? L'éventuelle relaxation est-elle médiée par le GMPc comme dans les vaisseaux ?

Afin de pouvoir répondre à ces questions, nous avons utilisé un modèle de cuve à organe isolé. Nous avons ainsi pu tester la réactivité utérine *in vitro* à un précurseur – la L-arginine - et un donneur de NO – le nitroprussiate de sodium (SNP) - en présence et en absence d'un inhibiteur de la guanylate cyclase – le bleu de méthylène $10^{-5}M$ -. Nous avons également observé l'effet d'un analogue stable du GMPc – le 8-bromo-GMPc - sur la contractilité spontanée.

Nos résultats montrent que :

- la L-arginine induit une relaxation concentration-dépendante ($pD_2 = 3.65 \pm 0.15$ et $E_{max} = 55.28 \pm 10.85$ % d'inhibition de la contraction utérine).

- le SNP induit également une relaxation concentration-dépendante ($pD_2 = 5.65 \pm 0.18$ et $E_{max} = 87.80 \pm 9.29 \%$ d'inhibition de la contraction utérine).

- le 8-bromo-GMPc n'a pas d'action relaxante sur le myomètre humain non gravide.

- le prétraitement par le bleu de méthylène induit une potentialisation significative ($p = 0,008$) de l'action du SNP et une tendance à la potentialisation de l'action de la L-arginine.

Ces résultats apportent une preuve fonctionnelle *in vitro* de la présence d'une NOSynthase dans le muscle lisse utérin humain non gravide. D'autre part, ils remettent en cause le rôle *in vitro* du GMPc dans la relaxation utérine. La voie de relaxation du muscle lisse utérin serait différente de celle intervenant dans le muscle lisse vasculaire.

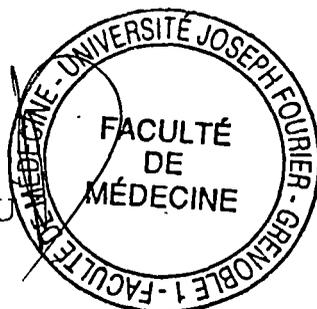
Cette étude appelle donc de nouvelles expériences qui permettraient de mieux comprendre les mécanismes intracellulaires aboutissant à la relaxation du myomètre, afin de mieux pouvoir traiter *in vivo* les contractions inopportunes, tant sur les utérus pré-gravides en fécondation *in vitro* que dans les menaces d'accouchement prématuré.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble le 21/09/99

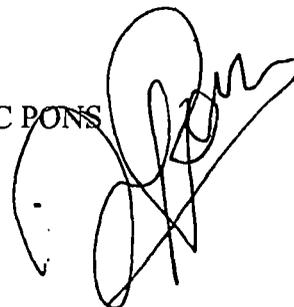
LE DOYEN

J.L DEBRU



LE PRESIDENT DE THESE

J.C PONS



BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 – AMBER I.J, HIBBS J.B JR, TAINTOR R.R, VAVRIN Z.
Cytokines induce an L-arginine-dependent effector system in nonmacrophages cells. J Leukocyte Biol 1988 ; 44 : 58-65.
- 2 – ANHURADA P, THALMPAN R.V.
Synthesis of gap junction proteins and collagenases in the preimplantation rat uterus. Membr Biochem 1993 ; 10 : 163-9.
- 3 - ANWER K, OBERTI C, PEREZ G.J, PEREZ-REYES N, MACDOUGALL J.K, MONGA M, STEFANI E, TORO L.
Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. Am J Physiol 1993 ; 265 : C976-85.
- 4 - BASSIL S, MAGRITTE J.P, ROTH J, NISOLLE M, DONNEZ J, GORDTS S.
Uterine vascularity during stimulation and its correlation with implantation in in vitro fertilization. Fertil Steril 1996 : 337-81.
- 5 - BOLOTINA V.M, NAJIBI S, PALACINO J.J, PAGANO P.J, COHEN R.A.
Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular Smooth muscle. Nature 1994 ; 368 : 850-3.
- 6 - BRADLEY K.K, BUXTON I.L.O, BARBER J.E, MCGAW T, BRADLEY M.I .
Nitric oxide relaxes human myometrium by a cGMP-independent mechanism. Am J Physiol 1998 ; 275 : C1668-73.
- 7 – BUHIMSCHI I, YALLAMPALLI C, DONG Y.L, GARFIELD R.E.
Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. J Obstet Gynecol 1995 ; 172 : 1577-84.

- 8 – CABROL D, GRANGE G, DE SPIRLET M, DUPRE LA TOUR M.
Les nouveaux tocolytiques. Vème journées d'obstétrique de bordeaux 1998.
- 9 - CAMERON IT, CAMPBELL S.
Nitric oxide in the endometrium. Hum Reprod Update 1998 ; 4 : 565-9.
- 10 - CICINELLI E, IGNARRO L.J, LOGRANO M, GALANTINO P, BALSANO G, SCHONAUER L.M.
Circulating levels of nitric oxide in fertile women in relation to the menstrual cycle. Fertil Steril 1996 : 1036-9.
- 11 - CICINELLI E, IGNARRO L.J, LOGRANO M, MATTEO G, FALCO N, SCHONAUER L.M.
Acute effects of transdermal estradiol administration on plasma levels of nitric oxide in post menopausal women. Fertil Steril 1997 : 63-66.
- 12 – DENNES W.J, SLATER D.M, POSTON L, BENNETT P.R.
Myometrial nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid expression does not change throughout gestation or with the onset of labor. Am J Obstet Gynecol 1999 ; 180 : 387-92.
- 13 - DE ZIEGLER D, FANCHIN R, DE MOUSTIER B, BULLETTI C.
The hormonal controle of endometrial receptivity : estrogen (E2) and progesterone. J Reprod Immunol 1998 ; 39 : 149-66.
- 14 - DI IORIO R, MARINONI E, COSMI E.V.
New peptides, hormones and parturition. Gynecol Endocrinol 1998 ; 12 : 429-34.
- 15 – ENYEDI A, MINAMI J, CARIDE A.J, PENNISTON J.T.
Characteristics of the Ca⁺⁺ pump and Ca⁺/ATPase in the plasma membrane of rat myometrium. Biochem J 1988 ; 252 : 215-220.

- 16 - EKERHOVD E, BRÄNNSTRÖM M, DELBRO D, NORSTRÖM A.
Nitric oxide-mediated inhibition of contractile activity in the human uterine cervix. Mol Hum Reprod 1998 ; 4 : 915-20.
- 17 - EKERHOVD E, WEIDEGARD B, BRANNSTROM M, NORSTROM A.
Nitric oxide-mediated effects on myometrial contractility at term during prelabor or labor. Obstet gynecol 1999 ; 93 : 987-94.
- 18 - FACCHINETTI F, NERI I, GENAZZANI A.R.
L-arginine infusion reduces preterm uterine contractions. J Perinat Med 1996 ; 24 : 283-5.
- 19 - FANCHIN R, DE ZIEGLER D, BERGERON C, RIGHINI C, TORRISI C, FRYDMAN R.
Transvaginal administration of progesterone. Obstet Gynecol 1997 ; 90 : 396-401.
- 20 - FANCHIN R, RIGHINI C, OLIVENNES F, TAYLOR S, DE ZIEGLER D, FRYDMAN R.
Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization Hum Reprod 1998 ; 13 : 1968-74
- 21 - FOMIN V.P, COX B.E, WORD R.A.
Effect of progesterone on intracellular Ca⁺⁺ homeostasis in human myometrial smooth muscle cells. Am J Physiol 1999 ; 276 : C379-85
- 22 - FURCHGOTT R.F, ZAWADSKI J.V.
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980 ; 288 : 373-6.
- 23 - GANGULA P.R.R, DONG Y.L, YALLAMPALLI C.
Rat myometrial smooth muscle cells express endothelial nitric oxide synthase. Hum Reprod 1997 : 561-8.

- 24 - GARFIELD R.E, HAYASHI R.H.
Appaerance of gap-junction in the myometrium of women during labor.
Am J Obstet Gynecol 1981 ; 140 :254-60.
- 25 - HAMADA Y, NAKAYA Y, HAMADA S, HAMADA M, AONO T.
Activation of K⁺ channels by ritodrine hydrochloride in uterine smooth muscle cells from pregnant women. Eur J Pharmacol 1994 ; 288 : 45-51.
- 26 - HARRISON DG, BATES JN.
The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. Circulation 1993 ; 87 : 1461-7.
- 27 - HENNAN J.K, DIAMOND J.
Evidence that spontaneous contractile activity in the rat myometrium is not inhibited by NO-mediated increases in tissue levels of cyclic GMP. Br J Pharmacol 1998 ; 123 : 959-67.
- 28 - HENRY G, GUISSANI A.
Le monoxyde d'azote : un effecteur biologique. Détection par résonance paramagnétique électronique. TCB 1994 ; 2 : 157-64
- 29 - HUSZAR G.
Biology and biochemistry of myometrial contractility and cervical maturation.
Semin Perinatol 1981 ; 5 : 216-235.
- 30 - IGNARO L.P, LIPPTON H, EDWARDS J.C, BARICOS W.H, HYMAN A.L,
KADOWIT P.J, GRUETTER C.A.
Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide : evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. J Pharmacol Exp Ther 1981 ; 218 : 739-49.
- 31 - IZUMI H, YALLAMPALLI C, GARFIELD R.E.
Gestationnall changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle. Am J Obstet Gynecol 1993 ; 169 : 1327-37.

- 32 - JONES G.D, POSTON L.
The role of endogenous nitric oxide synthetis in contractility of term and preterm human myometrium. Br J Obstet Gynaecol 1997 ;104 : 241-5.
- 33 – **Transdermal nitroglycerine in the management of pain associated with primary dysmenorrhoea :a multinational pilot study. The Transdermal Nitroglycerine/Dysmenorrhoea Study Group.** J Int Med Res 1997 ; 25 : 41-4.
- 34 - KAYA T, CETIN A, SARIOGLU Y.
Changes in the nitric oxide system of rat myometrium during midgestation and delivery at term. Pharmacol Res 1998 ; 37 : 403-8.
- 35 – KHORRAM O, GARTHWAITE M, MAGNESS R.R.
Endometrial and myometrial expression of nitric oxide synthase isoforms in pre- and postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 1999 ; 84 : 2226-32.
- 36 - KILARSKI W.M, FU X, ROOMANS G.M, BACKSTROM T, ULSTEN U.
In vitro effect of Hepes buffer on maintening the number of gap junction plaques in human myometrium at term. Folia Histochem Cytobiol 1995 ; 33 : 151-5.
- 37 - KOTRZEVSKA A, LAUDANSKI T, BATRA S.
Potent inhibition by tamoxifen of spontaneous and agonist-induced contractions of the human myometrium and intramyometrial arteries. Am J Obstet Gynecol 1997 ; 176 : 381-6.
- 38 - KUENZLI K.A, BRADLEY M.F, BUXTON I.L.
Cyclic GMP-independent effect of nitric oxide on guinea-pig uterine contractility. Br J Pharmacol 1996 ; 119 : 737-43.
- 39 – KUENZLI K.A, BUXTON I.L.O, BRADLEY M.E.
Nitric oxide regulation of myometrial contractility. Br J Pharmacol 1998 ; 124 : 63-8.

- 40 – LABROUCHE-COLOMER S, DERACHE P, JOUZIER E.
Le monoxyde d'azote : détection et rôle cardiovasculaire. Bull Soc Pharm
Bordeaux 1994 ; 133 : 171-89
- 41 - LEES C, CAMPBELL S, JAUNIAUX E, BROWN R, RAMSAY B, GIBB D,
MONCADA S, MARTIN JF.
**Arrest of preterm labour and prolongations of gestation with glyceryl trinitrate,
and nitric oxide donor.** Lancet 1994 : 1325-26
- 42 - LEFEBVRE D.L, PIERSANTI M, BAI X.H, CHEN Z.Q, LYE S.J.
Myometrial transcriptional régulation of the gap junction gene, connexin-43.
Reprod Fertil Dev 1995 ; 7 : 603-11
- 43 – LYALL F, BULMER J.N, KELLY H, DUFFE E, ROBSON S.C.
**Human trophoblast invasion and spiral artery transformation : the role of nitric
oxide.** Am J Pathol 1999 ; 154 : 1105-14.
- 44 - MIYOSHI H, BOYLE M.B, MACKAY L.B, GARFIELD R.E.
Gap junction currents in cultured muscle cells from human myometrium. Am J
Obstet Gynecol 1998 ; 178 : 588-93.
- 45 - MODZELEWSKA B, SIPOWICZ M.A, SAAVEDRA J.E, KEEFER L.K,
KOSTRZEWSKA
**Involvement of K⁺ATP channels in nitric oxide-induced inhibition of spontaneous
contractile activity of nonpregnat human myometrium.** A. Biochem Biophys Res
Commun 1998 ; 253 : 653-7.
- 46 – MONCADA S, PALMER R.M.J, HIGGS E.A.
Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev
1991 ; 43 : 109-135.

- 47 - MORISSON J.J, ASHFORD M.L, KHAN R.N, SMITH S.K.
The effect of potassium channel openers on isolated pregnant human myometrium before and after the onset of labor : potential for tocolysis. Am J Obstet gynecol 1993 ; 169 : 1277-85.
- 48 - MÜLSCH A, BUSSE R.
Ng-nitro-L-arginine impairs endothelium-dependent dilatations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthetis from L-arginine. Arch Pharmacol 1989 ; 143-7.
- 49 - NORMAN J.E, CAMERON I.T.
Nitric oxide in the human uterus. Rev Reprod 1996 ; 1 : 61-8.
- 50 - NORMAN J.E, THOMPSON A.J, TELFER J.F, YOUNG A, GREER I.A, CAMERON I.T.
Myometrial constitutive nitric oxide synthase expression increased during human pregnancy. Mol Hum reprod 1999 ; 5 : 175-81.
- 51 - NORMAN J.E, WARD L.M, MARTIN W, CAMERON A.D, MACGRATH J.C, GREER I.A, CAMERON I.T.
Effects of cGMP and the nitric oxide donors glyceryl trinitrate and sodium nitorprussiate on contractions in vitro of isolated myometrial tissue from pregnant women. J Reprod Fertil 1997 ; 110 : 249-54.
- 52 - NORRIS L.A, HIGGINS J.R, DARLING M.R, WALSH J.J, BONNAR J.
Nitric oxide in the uteroplacental, fetoplacental, and peripheral circulations in preeclampsia. Obstet Gynecol 1999 ; 93 : 958-63.
- 53 - OCHIAI K, OHURA K, NAKANO M, SAKIHIRA K, SHIMIZU Y, TERASHIMA Y.
Ca⁺⁺ sensitivity of skinned uterine muscle fibers in unilaterally pregnant rats. J Smooth Muscle Res 1993 ; 29 : 1-7.

- 54 – PALMER R, FERRIGE AG, MONCADA S.
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived factor. Nature 1987 ; 327 : 22-7.
- 55 – PALMER R.M, REES D, ASHTON D.S, MONCADA S.
L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. Biochem Biophys Res Commun 1988 ; 153 : 1251-6.
- 56 – PEREZ G, TORO L.
Differential modulation of large-conductance Kca channels by PKA in pregnant and nonpregnant myometrium. Am J Physiol 1994 ; 266 : 1459-63.
- 57 – PIEPER GM, SIEBENEICH W.
Use of a nitronyl nitroxide to discriminate the contribution of nitric oxide radical in endothelium-dependent relaxation of control and diabetic blood vessels. J Pharmacol ExpTher 1997 ; 283 : 138-47.
- 58 – REES D.D, PALMER R.M.J, HODSON H.F, MONCADA S.
A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. Br J Pharmacol 1989 ; 96 : 418-24.
- 59 – RICHARD V , BERDEAUX A.
Dérivés nitrés et donneurs de monoxyde d'azote. dans « Médications cardiovasculaires et respiratoires » Guidicelli, Berdeaux, Advenier (Eds) Herman PARIS 1998.p 199-212.
- 60 – ROGERS P.A.W, MURPHY C.R, SQUIRES K.R, MACLENNAN A.H.
Effect of relaxine on the distribution and antemesometrial positioning and orientation of rat blastocysts before implantation. J Reprod Fertil 1983 ; 68 : 431-5.

- 61 – RUTH P, WANG G.N, BOEKHOFF J, MAY B, PFEIFER A, PENNER R, KORTH M, BREER H, HOFMANN F.
Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-triphosphate production. Proc Natl Acad Sci USA 1993 ; 90 : 2623-7.
- 62 - SANBORN H.M.
Ion channels and the control of myometrial electrical activity. Semin Perinatol 1995 ; 19 : 31-40.
- 63 – SELKE F.W, MYERS P.R, BATES J.N, HARRISON D.G.
Influence of vessel size on the sensitivity of porcine coronary microvessels to nitroglycerin. Am J Physiol 1990 ; 258 : H515-20.
- 64 – SKAJAA K, EVERTS M.E, CLAUSEN T, FORMAN A.
Effects of magnesium and terbutaline on contractility and K⁺ uptake in isolated human uterine muscle. Am J Obstet Gynecol 1991 ; 165 : 1543-51.
- 65 – SLADEK S.M, REGENSTEINA.C, LYKINS D, ROBERTS J.M.
Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1993 ; 169 : 1285-91.
- 66 – SOMLYO A.P, SOMLYO A.V.
Smooth muscle : pharmacology and physiology. Edition INSERM. Paris 1975.
- 67 - STANKE-LABESQUE F, CRACOWSKI J.L.C, DEVILLIER P, CARON F, BESSARD G.
Functional assesement of rat aorta after storage in different media. Fund Clin Pharmacol 1999; 13 : 310-319.
- 68 - STEER C.V, TAN S.L, DILLON D, MASON B.A, CAMPBELL S.
Vaginal color doppler assessment of uterine artery impedance correlates with immunohistochemical markers of endometrial receptivity required for the implantation of an embryo. Fertil Steril 1995 : 101-108.

- 69 - STOCKAND J.D, SAMSON S.C.
activation by methylene blue of large Ca^{++} -activated K^+ channels. Biochim Biophys Acta 1996 ; 1285 : 123-6.
- 70 - TAGGART M.J, MENICE C.B, MORGAN K.G, WRAY S.
Effect of metabolic inhibition on intracellular Ca^{++} , phosphorylation of myosin regulatory light chain and force in rat smooth muscle. J Physiol (Lond) 1997 ; 499 : 485-96.
- 71 - TEKAY A., MARTIKAINEN H, JOUPILLA P.
Blood flow changes in uterine and ovarian vasculature, and predictive value of transvaginal pulsed colour doppler ultrasonography in an in vitro fertilization program. Hum Reprod 1995 : 688-93.
- 72 - TELFER J.F, LYALL F, NORMAN J.E, CAMERON I.T.
Identification of nitric oxide synthase in human uterus. Hum Reprod 1995 ; 10 : 19-23.
- 73 - TSCHUGGUEL W, SCHNEEBERGER C, LASS H, STONEK F, ZAGHLULA M.B, CZERWENKA K, SCHATTEN C, KAIDER A, HUSSLEIN P, HUBER J.C.
Human cervical ripening is associated with an increase in cervical inducible nitric oxide synthase expression. Biol Reprod 1999 ; 60 : 1367-72.
- 74 - TSCHUGGUEL W, SCHNEEBERGER C, UNFRIED G, BRAUTIGAM G, STONEK F, WIESER F, VYTISKA-BINSTORFER E, CZERWENKA K, WENIGER W, KAIDER A, BURSCH W, BREITSCHOPF H, HUBER J.C.
Elevation of inducible nitric oxide synthase activity in human endometrium during menstruation. Biol Reprod 1999 ; 60 : 297-304.
- 75 - WEINER C.P, THOMPSON L.P.
Nitric oxide and pregnancy. Semin Perinatol 1997 ; 21 : 367-80.

- 76 – WORD R.A, CASEY M.L, KAMM K.E, STULL J.T.
Effect of cGMP on $[Ca^{++}]_i$, myosin light chain phosphorylation, and contraction in human myometrium. Am J Physiol 1991 ; 260 : C861-7.
- 77 – WUYTACK F, RAEYMAEKERS L, VERBIST J, JONES L.R, CASTEELS R.
Smooth-muscle endoplasmic reticulum contains a cardiac-like form of calsequestrin. Biochem Biophys Acta 1987 ; 899 : 151-158.
- 78 - YAMPALLI C, DONG Y.L, GANGULA P.R, FAUG L.
Role and regulation of nitric oxide in the uterus during pregnancy and parturition. J Soc Gynecol Investig 1998 ; 5 : 58-67.
- 79 – YALLAMPALLI C, ISUMI H, BYAM-SMITH M, GARFIELD R.E.
An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1993 ; 170 : 175-85.

OUVRAGES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBERTS B. BRAY D. LEWIS J. RAFF M. ROBERTS K. WATSON J.

Biologie moléculaire de la cellule. 2^{ème} édition. Médecine-Sciences Flammarion. 1990

- GUIDICELLI, BERDEAUX, ADVENIER.

Médications cardiovasculaires et respiratoires. (Eds) Herman PARIS 1998.

- KAMINA P.

Anatomie gynécologique et obstétricale. 4^{ème} édition. Maloine s.a éditeur. 1984

- KAPLAN J.C, DELPECH M.

Biologie moléculaire et médecine. 2^{ème} édition. Médecine-Sciences Flammarion. 1996

- LANDRY L . GIES J.P.

Pharmacologie moléculaire. Médecine-Sciences. 1989

- PELMONT J.

Enzymes. Presse Universitaires de Grenoble. 1989

- RUSSO-MARIE F, PELTIER A, POLLA B.

L'inflammation. Médecine-Sciences : Clé pour. Edition John Libbey eurotext. 1998



Qui diis memorem laudes, repetimque fideles
 Ingenij dotes, Hippocratisque decus.
 Democriti auditor Phœbea, ô, Coc propago,
 Certius an quis te tradidit artis opes!

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

RESUME :

Le monoxyde d'azote possède des propriétés relaxantes sur la fibre musculaire lisse vasculaire. Par analogie structurelle, il est séduisant de penser que son action sur la fibre musculaire lisse emprunte les mêmes mécanismes d'action et que l'action myorelaxante du monoxyde d'azote est médiée par le GMPc comme deuxième messenger.

Sur un modèle expérimental *in vitro* de bandelettes d'utérus humain non gravide ont été testé l'effet de la L-arginine et du nitroprussiate de sodium sur la contraction spontanée, en la présence ou l'absence de bleu de méthylène, ainsi que l'action du 8-bromo-GMPc.

Les résultats montrent une action tocolytique du nitroprussiate de sodium, potentialisée par le blocage de la guanylate cyclase. Ils suggèrent qu'il existe une synthèse de NO à partir de la L-arginine et qu'il existe donc une NOSynthase fonctionnelle sur utérus humain non gravide. Les effets relaxants ne sont pas reproduits par un analogue stable du GMPc.

La voie de relaxation de l'utérus humain non gravide *in vitro* semble donc différente de celle des vaisseaux.

MOTS CLES :

- utérus humain non gravide
- L-arginine
- nitroprussiate de sodium
- guanylate cyclase
- 8-bromo-GMPc
- bleu de méthylène
- action relaxante
- potentialisation