



Mise en évidence, in vitro, de l'antagonisme du glibenclamide et du furosémide vis à vis du récepteur au thromboxane A2 du muscle lisse vasculaire humain

Françoise Stanke-Labesque

► To cite this version:

Françoise Stanke-Labesque. Mise en évidence, in vitro, de l'antagonisme du glibenclamide et du furosémide vis à vis du récepteur au thromboxane A2 du muscle lisse vasculaire humain. Sciences pharmaceutiques. 1996. dumas-01801090

HAL Id: dumas-01801090

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01801090>

Submitted on 28 May 2018

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

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

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

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

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



D 115 018655 1

Université Joseph FOURIER
Grenoble I - Sciences technologiques Médecine
UFR de PHARMACIE
Domaine de la Merci - La Tronche

Année 1996

Mémoire n° 7045

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMEDICALE

Présenté et soutenu publiquement le 14 Novembre 1996, par

Françoise STANKE LABESQUE
[Données à caractère personnel]

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 Octobre 1988 tient lieu de :

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

MISE EN EVIDENCE, IN VITRO, DE L'ANTAGONISME DU
GLIBENCLAMIDE ET DU FUROSÉMIDE VIS A VIS DU
RÉCEPTEUR AU THROMBOXANE A2 DU MUSCLE LISSE
VASCULAIRE HUMAIN.

JURY

PRESIDENT

Monsieur le Professeur Pierre DEMENGE
Professeur de Pharmacologie - Grenoble

MEMBRES

Monsieur le Professeur Germain BESSARD
Professeur de Pharmacologie - Grenoble
Monsieur le Professeur Jean CALOP
Professeur de Pharmacie Clinique - Grenoble
Monsieur le Professeur Philippe DEVILLIER
Professeur de Pharmacologie - Reims
Madame le Docteur Christine MARIE
Maître de Conférence - Dijon
Monsieur le Docteur Luc FORONI
Praticien hospitalier - Grenoble



Université Joseph FOURIER
Grenoble I - Sciences technologiques Médecine
UFR de PHARMACIE
Domaine de la Merci - La Tronche

Année 1996

Mémoire n°

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMEDICALE

Présenté et soutenu publiquement le 14 Novembre 1996, par

Françoise STANKE LABESQUE

[Données à caractère personnel]

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 Octobre 1988 tient lieu de :

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

MISE EN EVIDENCE, IN VITRO, DE L'ANTAGONISME DU
GLIBENCLAMIDE ET DU FUROSÉMIDE VIS A VIS DU
RÉCEPTEUR AU THROMBOXANE A2 DU MUSCLE LISSE
VASCULAIRE HUMAIN.

JURY

PRESIDENT

Monsieur le Professeur Pierre DEMENGE
Professeur de Pharmacologie - Grenoble

MEMBRES

Monsieur le Professeur Germain BESSARD
Professeur de Pharmacologie - Grenoble
Monsieur le Professeur Jean CALOP
Professeur de Pharmacie Clinique - Grenoble
Monsieur le Professeur Philippe DEVILLIER
Professeur de Pharmacologie - Reims
Madame le Docteur Christine MARIE
Maître de Conférence - Dijon
Monsieur le Docteur Luc FORONI
Praticien hospitalier - Grenoble

A François et Romain,
A mes parents et ma soeur.

Je tiens à adresser mes remerciements :

A Monsieur le Professeur Pierre DEMENGE

Vous me faites le grand honneur d'accepter d'être le Président de ce jury.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Germain BESSARD

qui m'a accueillie dans son laboratoire.

Je vous suis très reconnaissante pour la confiance que vous m'avez accordée pendant 5 semestres d'internat pour la réalisation de différents travaux, et pour m'avoir permis de les réaliser dans les meilleures conditions.

Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude et de mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Professeur Jean CALOP

qui me fait le grand honneur de juger ce travail.

*Qu'il soit remercié de la confiance et des conseils dont il a fait preuve
durant les deux semestres d'internat passés dans son service.*

*Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma
sincère gratitude.*

A Monsieur le Professeur Philippe DEVILLIER

qui a eu l'initiative de ce projet et m'a permis de le réaliser grâce à son soutien permanent et sa confiance.

Je voudrais que tu trouves ici l'expression de mes remerciements les plus sincères. et de ma plus grande admiration.

A Madame le Docteur Christine MARIE

*qui a bien voulu m'honorer de son jugement pour ce travail.
Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.*

A Monsieur le Docteur Luc FORONI

qui avec gentillesse a accepté de participer à ce jury de thèse.

Je voudrais que tu trouves ici le témoignage de mon amitié .

sans oublier

Monsieur le Professeur Jean-Louis Magne, Monsieur le Professeur Dominique Blin, et le personnel infirmier des services de Chirurgie Vasculaire et de Chirurgie Cardiaque

Jean - Luc Cacowski pour notre collaboration amicale présente et future.

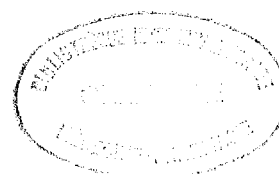
Emmanuelle Corompt pour son soutien constant et sa disponibilité.

Madame Ginette Baragatti et Madame Françoise Caron pour leur aide permanente et leur amitié.

Sommaire

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	- 6
INTRODUCTION	- 7
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I	
PHARMACOLOGIE DU TROMBOXANE A ₂	- 9
1 - Voie métabolique du thromboxane A ₂ (TXA ₂)	
1 - 1 Métabolisme général des prostanoides	
1 - 2 Métabolisme du TXA ₂	
2 - Pharmacologie du récepteur au TXA ₂	- 12
2 - 1 Classification des récepteurs aux prostanoides	
2 - 2 Récepteur au TXA ₂	
2 - 2 - 1 Description	
2 - 2 - 2 Signalisation transmembranaire	
2 - 2 - 3 Distribution des récepteurs au TXA ₂	
3 - Rôles physiologiques du TXA ₂	- 20
3 - 1 Propriétés biologiques générales des prostanoides	
3 - 2 Propriétés biologiques du TXA ₂	
4 - Implication du TXA ₂ dans certaines pathologies	- 23
4 - 1 TXA ₂ et pathologies cardiaques	
4 - 2 TXA ₂ et pathologies veineuses périphériques	
4 - 3 TXA ₂ et hypertension artérielle	



4 - 4 TXA ₂ et vasospasme cérébral	
4 - 5 TXA ₂ et pathologies pulmonaires	
4 - 6 TXA ₂ et pathologies rénales	
5 - Le TXA ₂ = cible thérapeutique	- 28
5 - 1 L'aspirine	
5 - 2 Les régimes à base d'huile de poisson	
5 - 3 Les inhibiteurs de la thromboxane synthétase	
5 - 4 Les antagonistes des récepteurs TP	
5 - 5 Les molécules mixtes	
CHAPITRE II	
PHARMACOLOGIE DU GLIBENCLAMIDE	- 34
1 - Structure chimique du glibenclamide	- 34
2 - Propriétés pharmacologiques du glibenclamide	- 34
2 - 1 Glibenclamide et métabolisme glucidique	
2 - 2 Glibenclamide et muscle lisse vasculaire	
2 - 3 Glibenclamide et prostanoïdes	
2 - 4 Glibenclamide et métabolisme lipidique	
3 - Pharmacocinétique du glibenclamide	- 37
CHAPITRE III	
PHARMACOLOGIE DU FUROSÉMIDE	- 39
1 - Structure chimique du furosémide	- 39
2 - Propriétés pharmacologiques du furosémide	- 39
2 - 1 Effets rénaux du furosémide	
2 - 2 Effets vasculaires du furosémide	
2 - 3 Interaction du furosémide avec les prostanoïdes	
2 - 4 Effets pulmonaires du furosémide	

3 - Propriétés pharmacocinétiques	- 44
PARTIE EXPERIMENTALE	
INTRODUCTION	- 46
MATERIELS ET METHODES	- 48
1 - Préparations des tissus	- 48
1 - 1 Artères mammaires internes (AMI)	
1 - 1 - 1 Origine et préparation des AMI	
1 - 1 - 2 Mise en tension des anneaux artériels	
1 - 2 Veines saphènes (VS)	
1 - 2 - 1 Origine et préparation des VS	
1 - 2 - 2 Mise en tension des anneaux veineux	
2 - Méthodologie	- 54
3 - Expression des résultats	- 55
4 - Analyse des résultats	- 56
5 - Produits et réactifs	- 61
RESULTATS	- 62
1 - Relation diamètre -tension des AMI	- 62
2 - Effets du glibenclamide	- 62
2 - 1 Effet du glibenclamide sur le tonus de base des AMI et des VS	
2 - 2 Effet du glibenclamide sur la contraction à l'U-46619 des AMI et VS	
2 - 3 Effet du glibenclamide sur la contraction à la 5-HT des VS, et sur la contraction à la noradrénaline et à l'endothéline des AMI	

3 - Effets du furosémide	- 70
3 - 1 Effet du furosémide sur le tonus de base des AMI et des VS	
3 - 2 Effet du furosémide sur la contraction à l'U-46619 des AMI et des VS	
3 - 3 Effet du furosémide sur la contraction à la 5-HT des VS et sur la contraction à la noradrénaline et à l'endothéline des AMI	
4 - Effet du GR32191 sur la contraction à l'U-46619 des AMI et des VS	- 78
DISCUSSION	
1- Analyse des courbes diamètre artériel-tension	- 81
2 - Effets du glibenclamide	- 81
2 - 1 Effet du glibenclamide sur le tonus de base	
2 - 1 Effet du glibenclamide sur la contraction à l'U-46619 des AMI et des VS	
2 - 1 Effet du glibenclamide sur la contraction à la 5-HT des VS et sur la contraction à la noradrénaline et à l'endothéline des AMI et des VS	
3 - Effets du furosémide	- 82
3 - 1 Effet du furosémide sur le tonus de base des AMI et des VS	
3 - 2 Effet du furosémide sur la contraction à l'U-46619 des AMI et des VS	

4 - Analyse de la diminution de la réponse contractile endothéline-dépendante des AMI en présence de furosémide et de glibenclamide	- 90
5 - Comparaison de l'antagonisme du glibenclamide et du furosémide vis-vis du TXA ₂ à un antagoniste de référence, le GR32191.	- 91
6 - Comparaison des PA ₂ du furosémide et du glibenclamide obtenus sur VS et AMI	- 92
7 - Etude relation structure - activité	- 93
CONCLUSIONS	- 94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 95

Abréviations

ABREVIATIONS

AC	Adénylate cyclase
ADN	acide désoxyribonucléique
AMI	artère mammaire interne
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
5-HT	5-hydroxy tryptamine
D	diamètre
DAG	diacyl glycérol
g	gramme
h	heure
HDL	lipoprotéine de haute densité
IP3	inositol triphosphate
LDL	lipoprotéine de faible densité
l	litre
mg	milligramme
μM	micromolaire
NO	monoxyde d'azote
norad	noradrénaline
PG	prostaglandines
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
TXA ₂	thromboxane A ₂
VS	veines saphènes

Introduction

INTRODUCTION

Les prostanoïdes constituent une grande famille de dérivés des phospholipides membranaires et présentent un large éventail de propriétés biologiques. Synthétisés et relargués par les éléments figurés du sang, l'endothélium vasculaire et la cellule musculaire lisse du vaisseau, ces composés sont de puissants médiateurs ou modulateurs du tonus musculaire des vaisseaux.

Les prostanoïdes sont des médiateurs locaux, dont la synthèse a pour conséquence une signalisation paracrine intercellulaire. Les réponses induites par ces prostanoïdes sont rapides (de l'ordre de trente secondes à une minute), limitées en durée car ce sont des produits rapidement dégradés, et localisées dans les cellules ou tissus environnants.

La famille des prostanoïdes compte de nombreux composés dont les effets physiologiques sont parfois opposés, et qui régulent un fragile équilibre dont dépend l'homéostasie de l'organisme. Cependant, dans certaines conditions cliniques telles que l'inflammation ou l'activation plaquettaire, ce fragile équilibre est rompu.

Depuis ces vingt dernières années, le thromboxane A₂ (TXA₂), puissant médiateur de l'agrégation plaquettaire et de la vasoconstriction, s'est progressivement imposé comme étant un prostanoïde impliqué dans de nombreuses situations pathologiques cardiaques, vasculaires, rénales et respiratoires. De ce fait, il est devenu une nouvelle cible thérapeutique potentielle qui a suscité l'intérêt de l'industrie pharmaceutique avec, pour conséquence, la synthèse d'une pléthore de molécules susceptibles d'atténuer ou d'inhiber les effets délétères du TXA₂.

Le glibenclamide et le furosémide sont deux médicaments commercialisés depuis de nombreuses années, le premier étant préconisé dans le traitement du diabète non-insulino dépendant pour son effet stimulateur de la synthèse d'insuline, le deuxième étant indiqué dans l'oedème aigu du poumon et l'hypertension artérielle essentielle du fait de son puissant effet diurétique. Par ailleurs, ces deux molécules exercent aussi des effets au niveau du muscle lisse vasculaire.

Une synthèse bibliographique permettra en premier lieu de présenter la pharmacologie du thromboxane A₂ et de préciser son rôle dans la pathogénèse de certaines maladies, notamment cardiaques et vasculaires. Puis, dans une deuxième partie, nous présenterons la mise en évidence, sur des préparations de muscles lisses vasculaires humains, d'une nouvelle propriété pharmacologique du glibenclamide et du furosémide - à savoir leur antagonisme vis-à-vis du thromboxane A₂ -, et l'intérêt clinique de la découverte de cette nouvelle propriété.

Ce travail rapporte les résultats d'une étude réalisée dans le laboratoire de pharmacologie de Messieurs les Professeurs Germain Bessard et Philippe Devillier, en collaboration avec les services de chirurgie vasculaire et de chirurgie cardiaque de Messieurs les Professeurs Jean-Louis Magne et Dominique Blin.

Partie bibliographique

CHAPITRE I

PHARMACOLOGIE DU THROMBOXANE A₂

1 - Voie métabolique du thromboxane A₂ (TXA₂)

Avant de nous intéresser plus particulièrement à la voie de synthèse du TXA₂, nous allons présenter le métabolisme général des prostanoïdes .

1 - 1 Métabolisme général des prostanoïdes

En réponse à certains stimuli mécaniques et hormonaux, et aux facteurs de la coagulation, l'acide arachidonique est relargué des phospholipides membranaires par l'action de la phospholipase A₂. Sous l'effet d'enzymes bifonctionnelles, les cyclo-oxygénases, l'acide arachidonique est oxydé en PGG₂ puis peroxydé en PGH₂ (Oates et col., 1988). Selon le type de cellules et leur équipement enzymatique, le PGH₂ sera métabolisé en PGD₂, PGF₂ alpha, PGI₂, PGE₂ ou TXA₂. Cette sélectivité cellulaire du métabolisme de la PGH₂ en prostanoïdes est souvent liée à la fonction de la cellule.

Enfin, il faut noter que le facteur limitant de la synthèse de prostaglandines est la libération d'acide arachidonique.

Le métabolisme général des prostanoïdes peut être résumé par la figure 1.



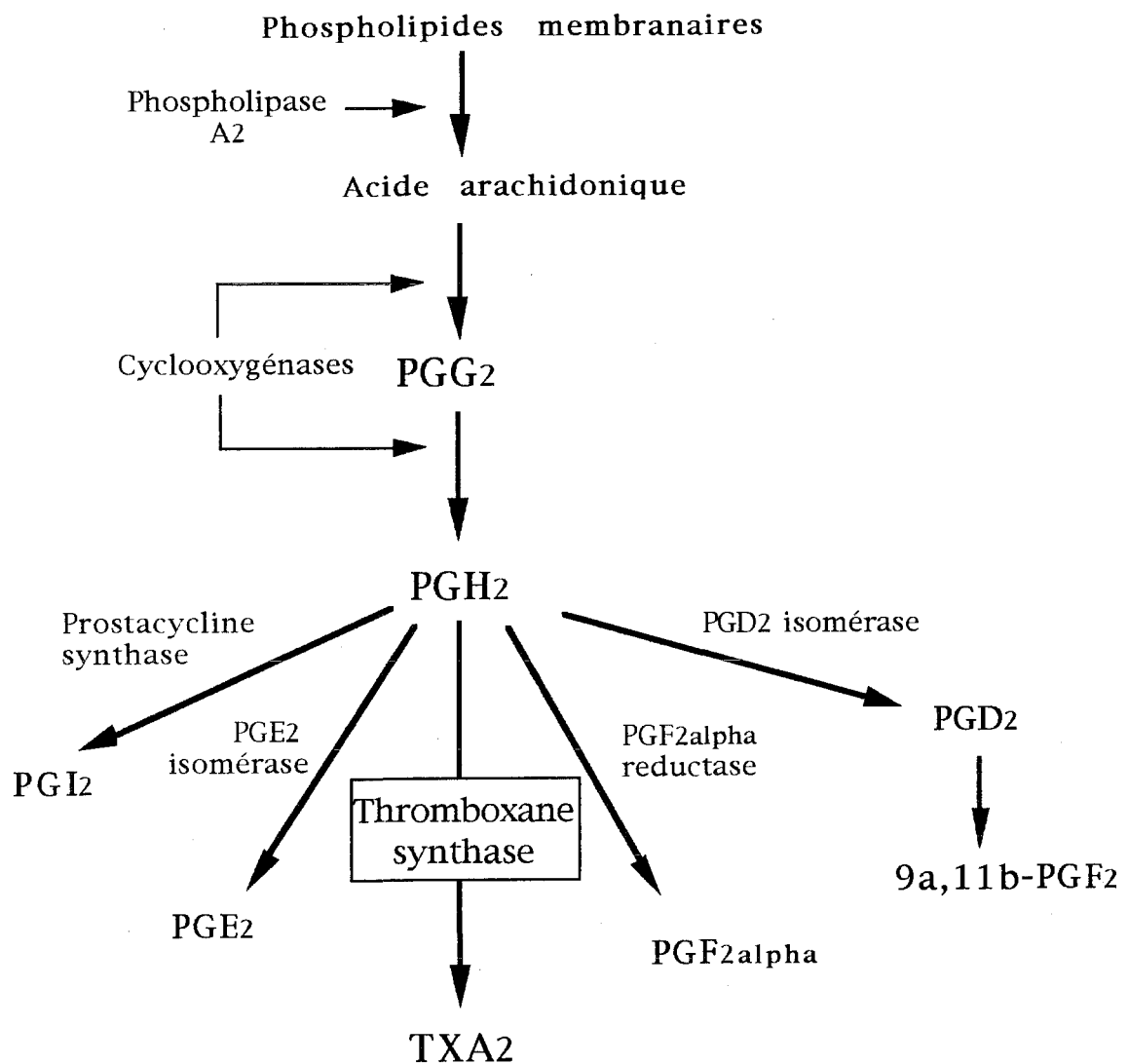


Figure 1 : Schéma général de la voie métabolique des prostanoïdes, d'après Devillier et col. (1996).

1 - 2 Métabolisme du TXA₂

Le thromboxane A₂ (Figure 2) est un métabolite majeur de l'acide arachidonique. Sa synthèse est dépendante des cyclo-oxygénases mais aussi de la thromboxane synthase qui isomérise le PGH₂ en TXA₂. Le TXA₂ est un métabolite instable - sa demi-vie est de 30 secondes - et est spontanément hydrolysé en milieu aqueux en TXB₂, composé dépourvu d'effet biologique mais plus stable, ce qui permet une approche quantitative du taux plasmatique de TXA₂ (Armstrong et col., 1995). Une représentation schématique de la voie métabolique du TXA₂ est proposée dans la figure 2.

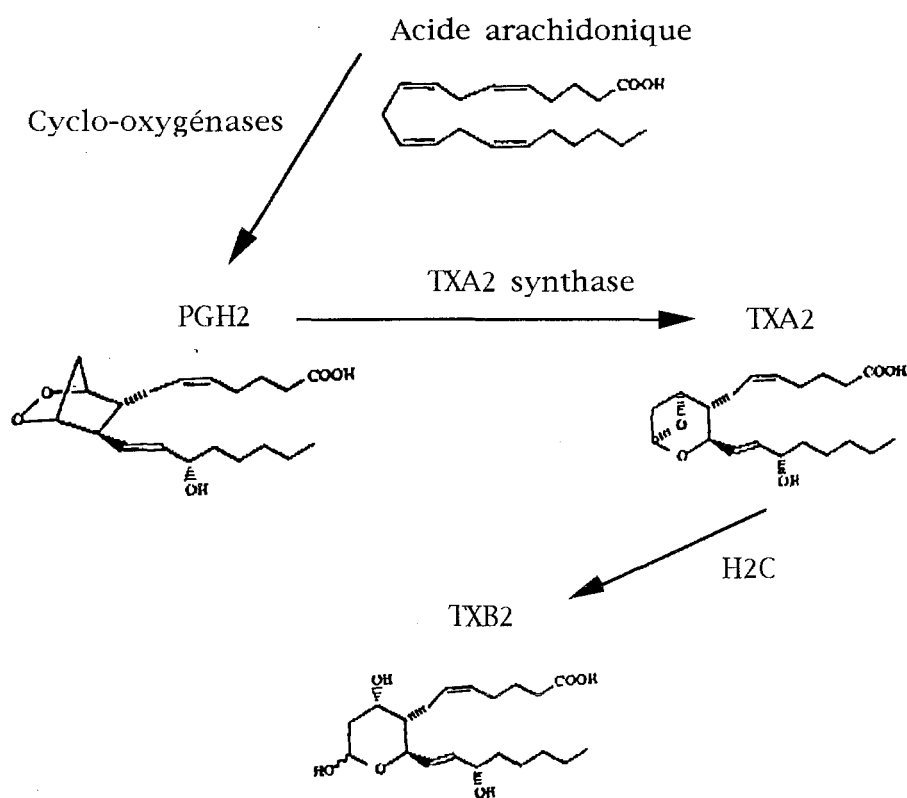


Figure 2 : Représentation schématique de la voie métabolique du TXA₂, d'après Armstrong et col., (1995)

La source majeure de TXA₂ dans les conditions physiologiques et pathologiques sont les plaquettes activées (Gresele et col., 1992), mais le TXA₂ est également synthétisé par les polynucléaires éosinophiles (Foegh et col., 1982), les macrophages et les monocytes (Juergens et col., 1992).

2 - Pharmacologie du récepteur au TXA₂

2 - 1 Classification des récepteurs aux prostanoïdes

Une classification et une nomenclature des récepteurs aux prostanoïdes ont été proposées par Coleman (1984 et 1994). Les récepteurs aux prostanoïdes sont intitulés récepteurs P et le récepteur pour lequel un prostanoïde présente la plus forte affinité sera précédé de l'initiale de ce prostanoïde. Chaque prostanoïde présente une affinité préférentielle pour un type de récepteur sur lequel les autres prostanoïdes peuvent également se fixer mais avec une affinité plus faible. En effet, les prostaglandines étant assez similaires d'un point de vue structural, elles peuvent se fixer sur les autres récepteurs aux prostanoïdes, en particulier à forte concentration (Armstrong et col., 1995).

On distingue ainsi des récepteurs au TXA₂ (TP), à la PGI₂ (IP), à la PGE₂ (EP), à la PGF₂ alpha (FP), et à la PGD₂ (DP).

2 - 2 Récepteur au TXA₂

Pour exercer ses effets, le TXA₂ se fixe sur un récepteur spécifique, le récepteur TP, qu'il partage avec son précurseur métabolique immédiat, le PGH₂ (Coleman et col., 1990).

Ce récepteur fut d'abord identifié par des études pharmacologiques, puis

par des études de binding, et plus récemment par l'apport de la biologie moléculaire.

2 - 2 - 1 Description du récepteur TP

Le récepteur TP est une protéine de 55 KDa (Borg et col., 1993) constitué de 343 acides aminés (Hirata et col., 1991).

L'étude de l'hydrophobicité de la séquence nucléotidique du récepteur TP a permis d'établir qu'il présentait 7 domaines transmembranaires, et que ce récepteur appartenait à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G insensibles à la toxine pertussique et la toxine du choléra (Hirata et col., 1991, Armstrong et col., 1995). La figure 3 donne une représentation schématique du récepteur TP, d'après Amstrong et col.(1995).

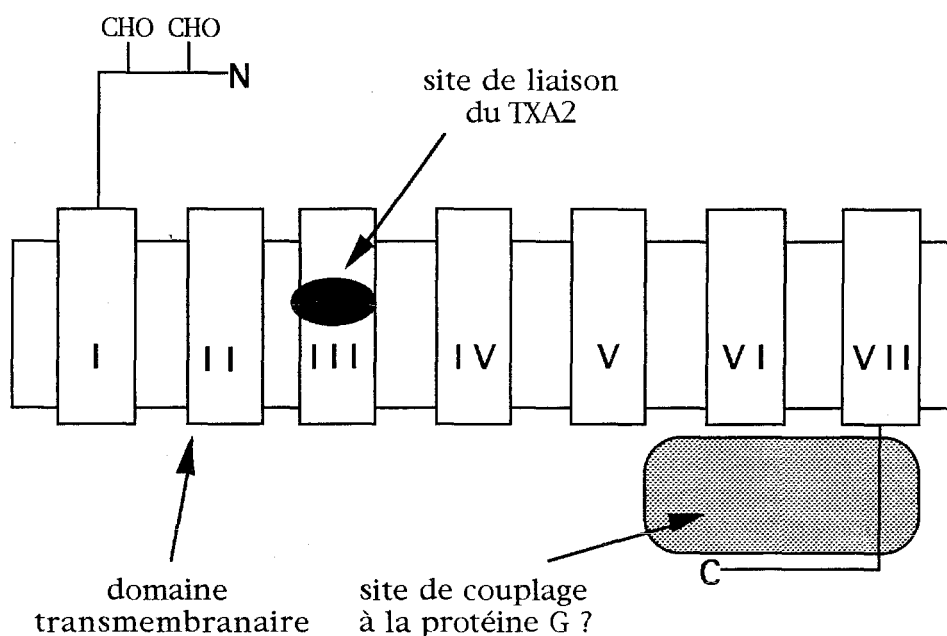


Figure 3 : Représentation schématique du récepteur TP, d'après Armstrong et col. (1995)

Du fait de la présence de résultats contradictoires obtenus par de nombreuses expériences pharmacologiques, l'existence d'un ou plusieurs sous-types de récepteurs TP fonctionnels est controversée. En effet, Lumley et col. (1989) ont montré que le GR32191, un antagoniste puissant et sélectif du récepteur TP, inhibait avec la même puissance l'agrégation plaquettaire et les réponses contractiles d'artères pulmonaires humaines, de veines saphènes, d'aortes de rats induites par l'U-46619, un analogue stable du TXA₂, ce qui suggère l'existence d'un seul type de récepteur TP.

A l'opposé, plusieurs études ont mis en évidence une hétérogénéité des récepteurs TP, entre espèces animales d'une part (Ogletree et col., 1991, Norman et col., 1992), et entre plaquettes et cellules musculaires lisses au sein d'une même espèce d'autre part (Mais et col., 1985, Dubé et col., 1992). Ainsi, Krauss et col. (1996) ont montré qu'un agoniste du récepteur TP, (l'AGN19203), était un puissant vasoconstricteur alors qu'il n'induisait qu'une faible agrégation plaquettaire. De plus, de récentes études utilisant des anticorps anti-récepteurs TP ont suggéré que les plaquettes humaines exprimaient des récepteurs TP différents de ceux présents sur le placenta et l'endothélium (Borg et col., 1993). Par ailleurs, la comparaison de la séquence nucléotidique du récepteur TP endothélial humain réalisée par Raychowdhury et col., (1994) à celle du récepteur TP de placenta humain (Hirata et col., 1991) a révélé l'existence d'un nouveau récepteur endothélial présentant une différence au niveau de son extrémité carboxyterminale. Cette légère différence structurale pourrait être due à un épissage alternatif lors de la phase de maturation (Raychowdhury et col., 1994, Pierce et col. 1995). Enfin, ce nouveau type de récepteur TP a également été localisé au niveau du placenta humain mais pas au niveau des plaquettes, ce qui pourrait suggérer que les récepteurs plaquettaires et vasculaires diffèrent.

Cependant, les études de biologie moléculaire avaient initialement orienté vers l'existence d'un seul type de récepteur. Par northern blot réalisé sur ARNm extrait de cellules mégacaryocytaires leucémiques, placenta humain et poumon humain, Hirata et col. (1991) n'ont révélé la présence que d'un seul type de récepteur TP. Plus récemment, le gène codant pour le récepteur TP a été isolé et séquencé à partir de placenta humain et de cellules mégacaryocytaires (Nüsing et col., 1993) et les auteurs ont démontré que, bien qu'un épissage alternatif du transcrit pouvait survenir, le gène isolé codait pour une protéine unique.

Il semblerait donc que la grande variabilité des résultats pharmacologiques observée soit inhérente à un couplage du récepteur TP à différents types de protéines G (Offermann et col., 1994) - comme cela a été démontré pour le récepteur EP (Coleman, 1994) - et à des différences concernant les systèmes de transduction du signal plutôt qu'à l'existence de plusieurs sous- types de récepteurs. Knezevic et col. (1993) confirment cette hypothèse en démontrant que le récepteur TP plaquettaire pouvait être couplé à plusieurs protéines G dont la protéine Gq. Les plaquettes présenteraient deux isoformes du récepteur TP, l'une responsable de l'agrégation, l'autre responsable de la sécrétion, mais les études de binding vont dans le sens de l'existence d'un seul type de récepteur pouvant exister sous deux conformations fonctionnelles différentes (Dorn et col., 1989).

Bien que l'état des connaissances ne permette pas de conclure, avec certitude, à l'existence d'un ou plusieurs types de récepteurs TP, le consensus actuel, fondé notamment sur l'analyse de la séquence nucléotidique (Hirata et col., 1991) et la présence d'un seul transcrit (Nüsing et col., 1993), serait en faveur de l'existence d'un même type de récepteur TP plaquettaire et vasculaire, et les différences d'intensité de réponse pharmacologique des récepteurs TP plaquettaires et vasculaires à certains agonistes pourraient être expliquées par

un couplage du récepteur TP à des systèmes différents de transduction du signal (Armstrong et col., 1995). De plus, au niveau du muscle lisse vasculaire, aucune donnée pharmacologique n'a permis de mettre en évidence l'existence de sous-types de récepteurs. Cependant, du fait de l'hétérogénéité des données, d'autres investigations seront nécessaires pour élucider ce problème.

2 - 2 - 2 Signalisation transmembranaire

Les événements survenant à la suite de l'activation du récepteur TP par le TXA₂ ont surtout été étudiés sur plaquettes humaines, où la stimulation du récepteur TP couplé à une protéine G_q conduit à l'activation d'une phospholipase C. L'activation de cette phospholipase C induit une libération d'inositol tri-phosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DAG) (Armstrong et col., 1995) avec pour conséquences une augmentation du Ca²⁺ intra-plaquettaire et une activation d'une protéine kinase C, responsables de la contraction du squelette d'actomyosine et de la sécrétion des granules des plaquettes. Par ailleurs, le couplage du récepteur TP plaquettaire à une protéine G_i entraîne une diminution du taux intra-plaquettaire d'AMPc conduisant également à la sécrétion et l'agrégation plaquettaires. Un résumé des événements cellulaires survenant à la suite de l'activation du récepteur TP plaquettaire est représenté par la figure 4.

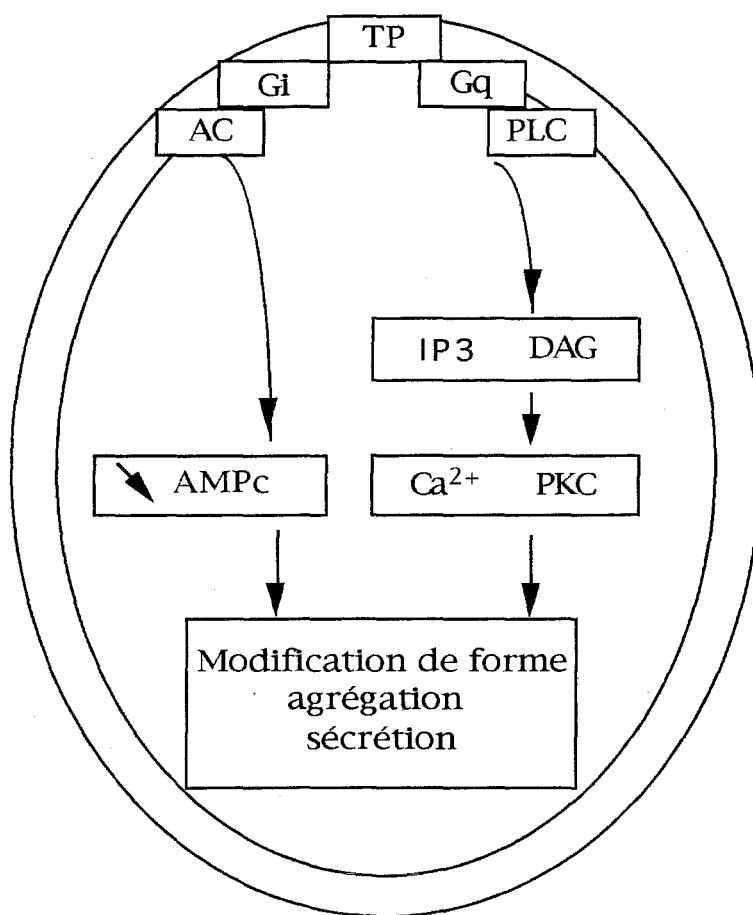


Figure 4 : Représentation schématique simplifiée du mécanisme d'action du TXA₂ sur la plaquette, d'après Gorman et col., (1978)

G = protéine G, PLC = phospholipase C, IP3 = inositol triphosphate, DAG = diacyl glycérol, AC = adénylate cyclase, PKC = protéine kinase C.

De même, sur muscle lisse d'aorte de rat, Dorn et col. (1992) ont mis en évidence que le relargage de Ca²⁺ induit par l'U-46619, un analogue stable du TXA₂, était temporairement associé à une phosphorylation des chaînes légères de la myosine, une accumulation de 1-4-5 inositol triphosphate, et une

acidification cellulaire, probablement via l'activation d'une ATPase Ca²⁺ dépendante.

L'inositol tri-phosphate étant un agoniste du récepteur canal, il stimule le relargage de Ca²⁺ par le réticulum sarcoplasmique, alors que le diacyl glycérol active une protéine kinase C dont un des rôles est de phosphoryler les chaînes légères des filaments de myosine.

La contraction du muscle lisse vasculaire est due à une interaction entre l'actine et la myosine ; elle est contrôlée par la concentration cytoplasmique de Ca²⁺ et la fixation du Ca²⁺ à la calmoduline. La calmoduline est une petite protéine présentant 4 domaines servant chacun à la fixation d'un ion Ca²⁺. La fixation du Ca²⁺ sur la calmoduline induit un changement de la conformation de la protéine lui permettant de se fixer à des protéines cibles. Le complexe Ca²⁺/calmoduline se lie en particulier avec la kinase des chaînes légères de la myosine, et ce complexe va catalyser une réaction de phosphorylation sur l'une des chaînes légères de la myosine permettant l'interaction actine-myosine et la contraction.

Lorsque la concentration intracytoplasmique en Ca²⁺ s'abaisse au-dessous de 10⁻⁷M, la réversibilité de ce phénomène est assurée par une phosphatase de la myosine, permettant la relaxation. La contraction du muscle lisse est donc régulée par 2 enzymes d'activités opposées dont la prédominance est fonction de la concentration en Ca²⁺ (Marche, 1992).

Le muscle lisse est donc une structure biologique capable, lors d'une stimulation, de convertir un signal chimique, la la libération de TXA₂, en un phénomène mécanique, la contraction.

L'ensemble de ces mécanismes est schématisé sur la figure 5 :

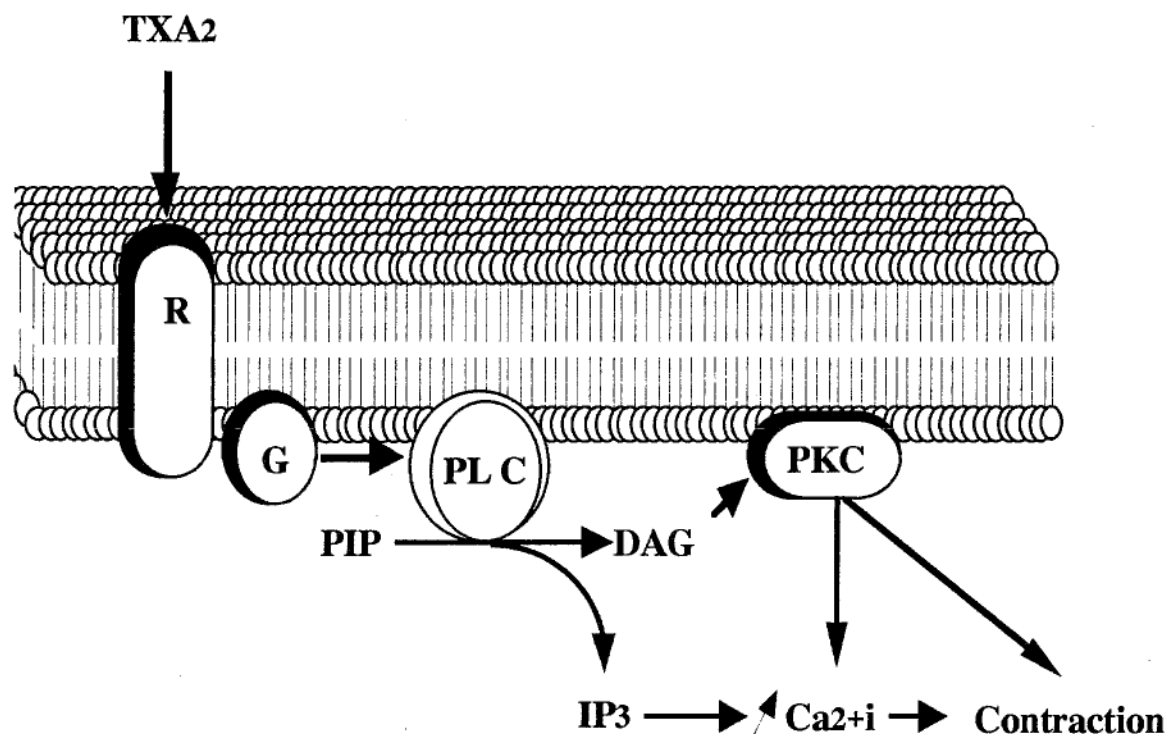


Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme d'action du TXA₂ sur la cellule musculaire lisse. (R = récepteur du thromboxane, G = protéine G, PL C = phospholipase C, PIP = polyphosphoinositides, DAG = diacyl glycérol, IP₃ = inositol triphosphate, PKC = protéine kinase C, Ca²⁺i : concentration calcique intracellulaire, d'après Marche, (1992).

2 - 2 - 3 Distribution des récepteurs TP

Récemment, Namba et col.(1993) ont étudié, par autoradiographie, la répartition des récepteurs TP chez la souris. Leur étude révèle que le récepteur TP est le plus abondamment exprimé dans le thymus, puis respectivement dans la rate, le poumon, le rein, le coeur et l'utérus. Des études similaires ont été

réalisées sur tissu humain (Hirata et col., 1991) et ont mis en évidence une expression supérieure du récepteur TP sur cellules de souches mégacaryocytaires par rapport au poumon.

De plus, les récepteurs TP sont largement distribués au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires (Coleman et col., 1994), et ils ont également été mis en évidence au niveau du tissu cérébral (Kondo et col., 1989).

3 - Rôle physiologique du TXA₂

Afin de mieux comprendre le rôle du TXA₂ dans les situations physiologiques normales, mais aussi son implication dans certaines pathologies, nous allons succinctement présenter les propriétés biologiques générales des prostanoïdes (Tableau 1).

3 - 1 Propriétés biologiques générales des prostanoïdes

Sur la base de leur activité sur le muscle lisse vasculaire, on peut schématiquement distinguer deux sous-groupes de prostanoïdes : celui des prostanoïdes vasodilatateurs composés du PGE₂, PGI₂ et celui des prostanoïdes vasoconstricteurs composés du TXA₂, le PGF₂ alpha et le PGD₂.

Parmi les prostanoïdes formés, le TXA₂ et la prostacycline (PGI₂) sont les composés les plus intéressants du fait de leurs propriétés biologiques opposées.

Un résumé des différentes propriétés biologiques des prostaglandines, de leur distribution et du récepteur spécifique à chacune d'entre elles peut être présenté par le Tableau 1, d'après Coleman (1994).

Prostaglandine	Effets biologiques	Récepteur spécifique	Distribution
PGD2	*Anti-agrégant		
	plaquettaire	DP > FP ET TP	Ubiquitaire
	*Vasodilatation		
	*Bronchoconstriction		
	*Hyperalgie		
PGE2	*Vasocontraction	EP1	
	*Vasorelaxation	EP2	Ubiquitaire
	*Inflammation	EP2	
	*Inhibition sécrétion acide	EP3	
	*Immunorégulation (immunosuppression)	EP4	
PGI2	*Anti-agrégant plaquettaire		Plaquettes
	*Vasodilatateur	IP	Muscle lisse et endothélium vasculaires
PGF2 alpha	* Reproduction	FP > TP et EP	Ubiquitaire
	*Vasoconstriction		
	*Bronchoconstriction		
TXA2	*Vasoconstriction		vaisseaux,
	*Agrégation plaquettaire	TP	poumon,
	*Bronchoconstriction		rate, rein

Tableau 1 : Résumé des propriétés biologiques des prostaglandines, de leurs récepteurs spécifiques et de leur localisation, d'après Coleman (1994).

3 - 2 Propriétés biologiques du TXA₂

Le rôle du TXA₂ a surtout été étudié dans les phénomènes de l'hémostase faisant intervenir les plaquettes sanguines et la paroi vasculaire.

Les conséquences physiologiques normales de la fixation du TXA₂ sur son récepteur plaquettaire sont la sécrétion du contenu des granules et l'agréga-tion plaquettaire secondaires à une diminution de l'AMPc intra-plaquettaire (Oates et col., 1988). Le TXA₂ induit aussi la synthèse d'ATP plaquettaire (Ambler et col., 1985) et favorise l'exposition d'un facteur d'adhésion plaquettaire, le complexe glycoprotéique gp IIb/IIIa, ce qui entretient l'activation plaquettaire et l'amplifie (Maseri et col., 1990).

Sur le muscle lisse vasculaire et bronchique, le TXA₂ provoque une puissante contraction. Des études réalisées *in vitro* sur artères mammaires internes (He et col., 1989b) et sur veines saphènes (Schilling et col., 1995) montrent que le TXA₂ est le plus puissant et le plus efficace agent vasoconstricteur.

Parce qu'il est hydrolysé rapidement en un métabolite inactif, le TXB₂, l'action du thromboxane reste très limitée au micro-environnement de son relargage.

Le TXA₂ est normalement produit à de très faibles doses dans la circulation sanguine chez le sujet sain. Il est relargué dans le courant circulatoire à un débit de 0,11 ng/Kg/min, principalement par les plaquettes (Gresele et col., 1991). Cependant lors de l'activation plaquettaire, ou d'une lésion du vaisseau, le taux de TXA₂ augmente et peut atteindre 10 ng/Kg. De plus, les patients atteints d'un déficit en cyclo-oxygénase et en thromboxane synthétase présentent un temps de saignement allongé, ce qui confirme le rôle du TXA₂ dans l'hémostase primaire.

Enfin, le TXA₂ pourrait également jouer un rôle immuno-modulateur car

des inhibiteurs de la thromboxane synthétase diminuent la prolifération de lymphocytes humains. Ces résultats sont intéressants compte tenu de la présence de récepteurs TP au niveau de la rate (Namba et col., 1993).

De même, des études réalisées sur préparations cellulaires d'artères coronaires de cobaye ont démontré qu'un analogue stable du TXA₂, le I-BOP, initiait la prolifération de cellules musculaires lisses, via l'activation d'une protéine kinase, ainsi qu'une élévation du Ca²⁺ libre intra-cellulaire (Morinelli et col., 1994).

4 - Implication du TXA₂ dans certaines pathologies

Le spectre des eicosanoïdes produits dans les tissus et les effets physiologiques qui en découlent varient suivant le type et le nombre de cellules inflammatoires. Plusieurs études ont suggéré que les produits des cyclo-oxygénases pouvaient contribuer au dommage vasculaire, à la formation d'oedème ou même à la mort cellulaire.

L'implication du TXA₂ dans certaines pathologies est basée sur le concept d'un déséquilibre entre la production de TXA₂ par les plaquettes et de PGI₂ par les cellules endothéliales (Cannon, 1984). Avant le développement d'antagonistes du récepteur TP spécifiques et administrables par voie orale, l'étude de l'implication du TXA₂ dans la pathogénèse de certaines maladies était difficile. En effet, le dosage du taux plasmatique de TXB₂, couramment évalué dans les études cliniques, n'est pas forcément un indicateur fiable et prédictif de l'implication du TXA₂ dans certaines situations pathologiques, car l'activation plaquettaire, survenant à la suite du prélèvement sanguin, augmente le taux de TXA₂ et donc de son métabolite, et peut ainsi constituer un artefact dans la mesure du taux plasmatique de TXB₂ (Brittain et col., 1985). Le dosage urinaire de

2-3 dinor TXB₂, un métabolite stable du TXA₂, est le meilleur marqueur de la production de TXB₂. Cependant, celui-ci n'est réalisé que dans peu d'études cliniques.

Le rôle du TXA₂ a surtout été mis en évidence grâce à l'utilisation d'outils pharmacologiques tels que les antagonistes du récepteur TP, ou des inhibiteurs de la synthèse de TXA₂. Le TXA₂, puissant médiateur de l'agrégation plaquettaire et de la vasoconstriction, joue donc un rôle prépondérant dans de nombreux désordres cardiovasculaires, respiratoires, rénaux et cérébraux.

4 - 1 TXA₂ et pathologies cardiaques

Les crises d'angor instable sont associées à une activation périodique des plaquettes, ce qui peut augmenter le risque d'occlusion coronaire par la formation d'un thrombus ou par le relargage de substances vasoactives par les plaquettes. De même, une augmentation du taux plasmatique de TXB₂ survient lors des épisodes douloureux (Fitzgerald et col., 1986a). Dans un modèle d'occlusion coronarienne induite par stimulation électrique, réalisé chez le chien (Fitzgerald et col., 1986b), l'administration d'antagonistes du récepteur TP favorise la reperfusion, en facilitant la désagrégation plaquettaire, et en exerçant un effet anti-vasoconstricteur.

Enfin, Coker et col. (1984) ont observé que l'administration d'un antagoniste du récepteur TP prévenait les troubles du rythme cardiaque survenant dans des situations d'ischémie et de reperfusion myocardique. Sur des chiens anesthésiés chez lesquels une occlusion de l'artère coronaire gauche a été réalisée, l'administration d'un antagoniste du récepteur TP diminue le nombre de battements cardiaques ectopiques survenant après l'ischémie cardiaque, et diminue l'incidence de la fibrillation ventriculaire survenant lors de la reperfusion.

Le TXA₂ est également un facteur spasmogène pouvant entraîner des complications dans les pontages aorto-coronariens. Teoh et col., (1987) ont mis en évidence une augmentation du taux de TXB₂ chez les patients ayant subi un pontage coronarien, et l'agrégation plaquettaire et la vasoconstriction artérielle, secondaires à la production excessive de TXA₂, pourraient contribuer à la morbidité des pontages cardiaques (Davies et col., 1980).

Ces nombreuses études soulignent l'importance du TXA₂ dans l'étiopathogénèse de certains troubles cardiaques.

4 - 2 TXA₂ et pathologies veineuses périphériques

Dans des modèles de thrombose veineuse, les antagonistes du récepteur TP diminuent l'incidence de la réocclusion, et dans certains cas diminuent le temps de thrombolyse et augmentent le débit de reperfusion, ce qui suggère que la restauration post-ischémique du flux est TXA₂ dépendante (Fitzgerald et col., 1986). De plus, Reilly et col. (1986) ont mesuré une augmentation du taux de bêta-thromboglobuline, un marqueur de l'agrégation plaquettaire, et de 2-3 dinor-TXB₂ urinaire chez des patients souffrant de la maladie de Raynaud, ce qui met en évidence l'implication du TXA₂ dans cette pathologie.

4 - 3 TXA₂ et hypertension artérielle

Les antagonistes du récepteur TP ont montré des effets variables dans différents modèles d'hypertension chez le rat, et diminuent significativement l'augmentation de la pression artérielle secondaire à l'administration

d'angiotensine II (Hall et col., 1991). Une étude réalisée dans le but d'étudier le rôle du TXA₂ dans la prolifération cellulaire chez des rats génétiquement hypertendus a suggéré que le TXA₂ était responsable de la prolifération exacerbée des cellules musculaires lisses (Ishimitsu et col., 1988). Ce résultat est d'autant plus intéressant que l'hypertension artérielle est associée à une augmentation de l'épaisseur de la média.

De plus, Osborne et col. (1988) ont montré que les antagonistes du récepteur TP prévenaient le développement de l'athérosclérose, en inhibant le dépôt de cholestérol sur la paroi du vaisseau sans modifier le taux sanguin de cholestérol.

En favorisant la prolifération cellulaire et par ses effets vasoconstricteurs, le TXA₂ semble donc être impliqué dans l'étiopathogénèse de l'hypertension artérielle.

4 - 4 TXA₂ et vasospasme cérébral

La présence de récepteurs TP au niveau cérébral a été mise en évidence par l'observation d'une vasoconstriction locale après l'administration intracérébrale de U-46619, et inhibée par l'administration d'un antagoniste du récepteur TP (le SQ29548) (Brittain et col., 1985). De même, dans deux modèles expérimentaux chez le chien, l'administration d'antagoniste du récepteur TP prévient la vasoconstriction cérébrale induite par l'administration intracorticale stéréotaxique d'un TXA₂-mimétique (le STA₂), et le vasospasme cérébral après hémorragie arachnoïdienne (Kondo et col., 1989). Ces études suggèrent que le TXA₂ est également un médiateur du vasospasme cérébral.

4 - 5 TXA₂ et pathologies pulmonaires

Des analogues stables du TXA₂ entraînent une bronchoconstriction et une augmentation de la pression dans l'artère pulmonaire, qui sont inhibées par des antagonistes du récepteur TP (Yoshimura et col., 1988). L'administration d'antagoniste du TXA₂ exerce également un effet bronchoprotecteur dans les tests de provocation bronchique effectués par l'inhalation d'allergènes ou par l'exercice. De plus, l'U-46619, un analogue stable du TXA₂, entraîne une augmentation de la sécrétion de mucus dans la trachée de rat (Yanni et col., 1988), et les cellules pulmonaires de sujets atopiques asthmatiques synthétisent 5 fois plus de TXA₂ après une épreuve de provocation avec un allergène, que les sujets sains (Pavord et col., 1992).

Par ailleurs, le TXA₂ stimule le système cholinergique et la libération d'acétylcholine, puisque la bronchoconstriction induite par un analogue stable du TXA₂ est atténuée par l'administration d'un antagoniste muscarinique (Sarooea et col., 1995).

Le TXA₂ stimule aussi l'extravasation des protéines plasmatiques, ce qui, associé à une puissante vasoconstriction de la veine et de l'artère pulmonaires, conduit à la formation d'un oedème important de la paroi bronchique (Yoshimura et col., 1988).

En favorisant la sécrétion bronchique, la bronchoconstriction et l'extravasation des protéines plasmatiques, le TXA₂ semble intervenir dans la pathogénèse de l'asthme (Devillier et col., 1996).

4 - 6 TXA₂ et pathologies rénales

L'augmentation de la production rénale de TXA₂ a été proposée comme étant un élément-clé dans la pathogénèse de certaines maladies rénales telles

que la glomérulonéphrite, la fibrose interstitielle, le syndrome néphrotique (Stork et col., 1986). En induisant une importante vasoconstriction de l'artère rénale, le TXA₂ diminue le flux sanguin rénal, la filtration glomérulaire, ainsi que l'excrétion urinaire d'électrolytes et d'eau (Oates et col., 1988a).

De plus, le TXA₂ semble également être impliqué dans les phénomènes de rejet des greffons rénaux, puisque des taux urinaires de TXB₂ supérieurs d'un facteur 2 ont été dosés chez des transplantés rénaux un à trois jours avant l'apparition des signes cliniques d'un rejet aigu (Foegh et col., 1981).

Par ailleurs, la néphrotoxicité de la ciclosporine serait partiellement dépendante du TXA₂ : une production rénale élevée de TXA₂ pourrait expliquer les événements thrombotiques et l'hypertension qui surviennent à la suite de cette thérapie (Coffman et col., 1987).

5 - Le TXA₂ = cible thérapeutique

Du fait de son implication dans de nombreuses situations pathologiques, le TXA₂ est devenu une cible thérapeutique potentielle intéressante. Plusieurs stratégies ont vu le jour pour inhiber ou diminuer les effets pro-agrégants plaquettaires et vasoconstricteurs du TXA₂ : les plus anciennes, mais aussi les moins sélectives, sont l'utilisation de l'aspirine et les régimes à base d'huile de poisson ; puis ont été développés des inhibiteurs de la thromboxane synthétase, des antagonistes du récepteur TP, et enfin des molécules mixtes présentant à la fois des propriétés antagonistes des récepteurs TP et inhibitrices de la synthèse de TXA₂.

5 - 1 L'aspirine

L'aspirine est un inhibiteur irréversible de la cyclo-oxygénase de tous les types de cellules, qui agit en acétylant le résidu sérine 530 de la poche hydrophobe de l'enzyme. Administrée à faible dose (320 à 1300 mg/jour puis 150 mg/jour) et de façon cumulative, l'aspirine permet une inhibition de la cyclo-oxygénase constitutive des plaquettes et des cellules endothéliales (Oates et col., 1988b). Or, les plaquettes sont des éléments cellulaires anucléés, et ne peuvent donc synthétiser de la cyclo-oxygénase inductible. La capacité des plaquettes aspirinées à synthétiser à nouveau du TXA₂ requiert alors la formation de nouvelles plaquettes dont le renouvellement est de 1 à 7 jours (Cannon, 1984). Ainsi, par l'administration quotidienne de faibles doses d'aspirine, l'agrégation plaquettaire médiée par le TXA₂ est inhibée. A l'opposé, les cellules endothéliales présentent une cyclo-oxygénase inductible donc préservent leur capacité à synthétiser de la prostacycline, même en présence d'aspirine.

Plusieurs études cliniques réalisées *versus* placebo ont ainsi démontré que l'aspirine, à faible dose, prévenait l'occlusion coronarienne lors des pontages aorto-coronariens (Lorentz et col., 1984), et exerçait un effet protecteur dans l'angor instable (Lewis et col, 1983).

5 - 2 Les régimes à base d'huile de poisson

Une alimentation riche en huile de poisson entraîne une modification des phospholipides membranaires, en particulier un enrichissement en acide eicosapentanoïque, ce qui conduit à la synthèse de TXA₃ qui est un plus faible agrégant plaquettaire que le TXA₂, et à la synthèse de PGI₃ qui, par contre, présente une activité vasodilatatrice identique à celle de la PGI₂.

Des études réalisées chez des Esquimaux du Groenland dont l'alimentation

est à base de poissons gras ont montré une incidence de l'infarctus du myocarde plus faible que celle observée dans les pays industrialisés (Oates et col., 1988b).

5 - 3 Les inhibiteurs de la thromboxane synthétase

Les inhibiteurs de la thromboxane synthétase offrent la perspective d'une diminution de la synthèse de TXA₂ et donc de ses effets pharmacologiques.

Théoriquement, les inhibiteurs de la thromboxane synthétase devraient présenter, par rapport à l'aspirine, l'avantage d'une inhibition sélective de la synthèse de TXA₂ sans diminution associée de la synthèse des autres prostanoides, notamment la PGI₂ endothéliale. Cependant, les premiers essais cliniques réalisés dans l'angor instable (Reuben et col., 1983, Hendra et col., 1983) et dans le syndrome de Raynaud (Reilly et col., 1986) ont été décevants. En effet, l'inhibition de la thromboxane synthétase pose le problème de la redirection du PGH₂. D'une part, l'inhibition de cette enzyme métabolique du TXA₂ entraîne une accumulation du substrat en amont, le PGH₂, qui peut se fixer également sur le récepteur TP et présente une activité vasoconstrictrice similaire à celle du TXA₂ (Coleman 1990). D'autre part, le PGH₂ va pouvoir utiliser les autres voies de synthèse et conduire à une augmentation de PGD₂ et de PGF₂ alpha qui vont également stimuler le récepteur TP.

Un schéma explicatif de l'hypothèse de la redirection du PGH₂ est représenté par la figure 6.

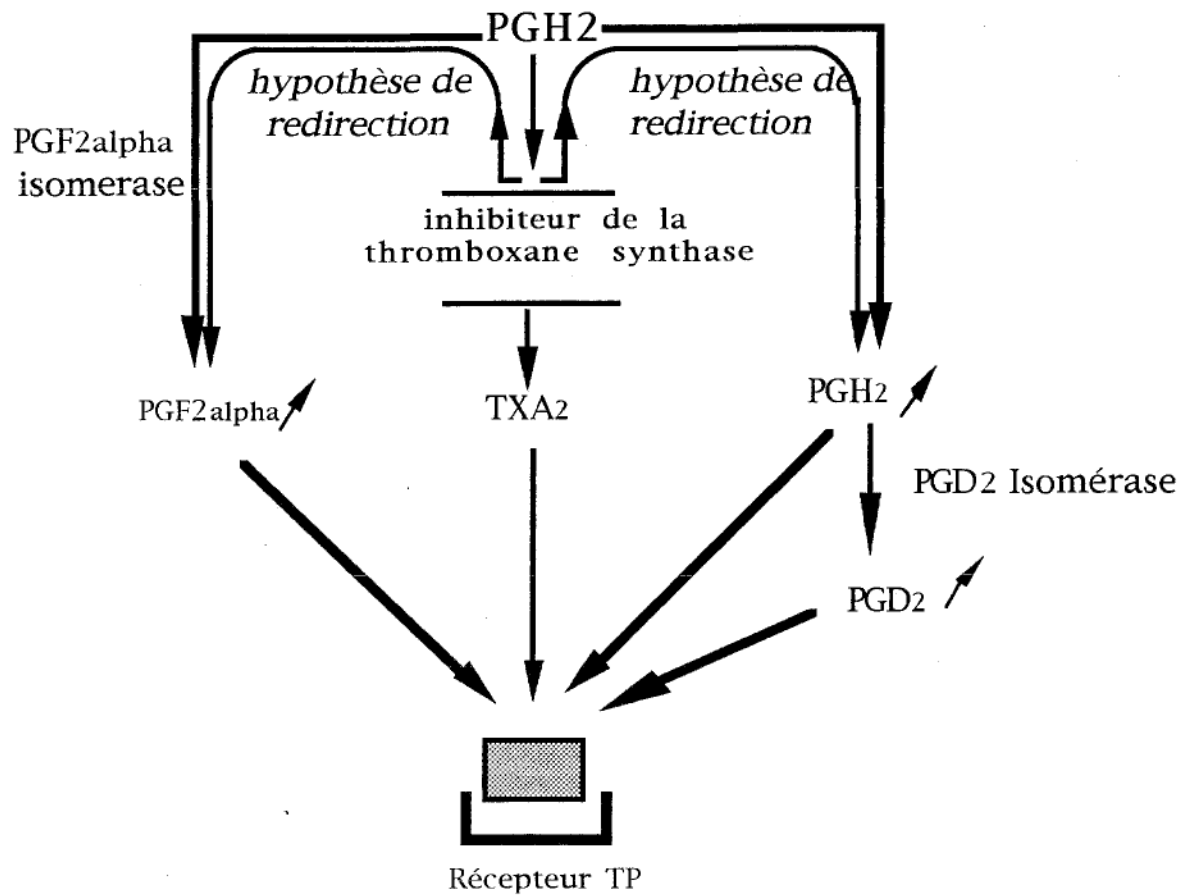


Figure 6 : Représentation schématique de l'hypothèse de la redirection du PGH₂ au niveau de la plaquette, d'après Gesele et col. (1991), et Devillier et col., (1996).

A cause de la redirection du PGH₂, les inhibiteurs de la thromboxane synthétase ne permettent pas de limiter de façon efficace les effets du TXA₂. Les mauvais résultats cliniques obtenus pourraient être dus, soit au fait que les plaquettes ne jouent qu'un rôle mineur dans la pathogénèse des syndromes étudiés, soit à une inhibition incomplète de la synthèse de TXA₂ dans la gamme de concentrations thérapeutiques d'inhibiteurs de la thromboxane synthétase utilisées en clinique (Oates et col., 1988b), ou encore à l'accumulation de PGH₂ et à sa redirection.

5 - 4 Les antagonistes du récepteur TP

Les antagonistes du récepteur TP présentent l'avantage, sur les inhibiteurs de la thromboxane synthase, de bloquer à la fois l'interaction théorique du TXA₂ et du PGH₂ sur le récepteur TP. De plus, si l'antagoniste est suffisamment sélectif, il pourrait exercer un effet protecteur sans inhiber la synthèse normale et surtout les effets des prostaglandines vasodilatatrices. Ainsi, les antagonistes du récepteur TP devraient inhiber l'agrégation plaquettaire, prévenir la vasoconstriction mais préserver la synthèse de PGI₂. Par contre, ce type de molécule est sans effet sur l'agrégation plaquettaire en réponse à l'adénosine et donc ne perturbe que peu l'hémostase primaire (Gresele et col., 1984).

Initialement, ces molécules ont suscité l'intérêt général dans le traitement des syndromes dépendants de l'activation plaquettaire, notamment l'occlusion vasculaire (Fitzgerald et col., 1986a). Une étude clinique, réalisée chez des sujets subissant un pontage aortobifémoral, a mis en évidence un effet anti-agrégant plaquettaire supérieur et une tolérance gastro-intestinale meilleure après l'administration d'un antagoniste du récepteur TP qu'après l'administration de l'association dypiridamole plus aspirine (Lane et col., 1984).

Cependant, la plupart de ces molécules sont des antagonistes compétitifs ; elles peuvent donc être déplacées du récepteur TP par les très importantes quantités de TXA₂ générées sur le site de l'activation plaquettaire.

Enfin, les antagonistes utilisés étant très sélectifs du récepteur TP, ils n'affectent pas l'activation plaquettaire induite par des agonistes indépendants du TXA₂ tels que le collagène à forte dose ou la thrombine (Gresele et col., 1991).

5 - 5 Les inhibiteurs mixtes

L'intérêt de développer des molécules mixtes, présentant à la fois des propriétés inhibitrices de la synthèse de TXA₂ et antagonistes du récepteur TP, réside dans le fait que l'activité antagoniste vis-à-vis du récepteur TP peut à la fois bloquer l'action pro-agrégante et vasoconstrictrice du PGH₂ accumulé à la suite de l'inhibition de la thromboxane synthétase. De plus, le PGH₂ peut être converti en PGD₂ par les plaquettes et en PGL₂ par les cellules endothéliales, ce qui entraîne une diminution de l'agrégation plaquettaire. De nombreux composés sont actuellement en évaluation clinique, et Gresele et col. (1991) ont mis en évidence, chez des volontaires sains, que l'administration d'inhibiteurs mixtes induisait un allongement du temps de saignement, par rapport à l'administration de fortes doses d'aspirine ou l'administration séparée d'un antagoniste du récepteur TP ou d'un inhibiteur de la thromboxane synthase, ce qui suggérerait une synergie d'effet.

En conclusion, le thromboxane A₂ est un médiateur important de l'agrégation plaquettaire et de la vasoconstriction impliqué dans de nombreuses pathologies notamment vasculaires et cardiaques, et contre lequel il existe, aujourd'hui, des molécules pharmacologiques efficaces destinées à diminuer sa synthèse ou à inhiber ses effets.

CHAPITRE II

PHARMACOLOGIE DU GLIBENCLAMIDE

1 - Structure chimique

La structure chimique du glibenclamide ou 5-chloro-N-[2-[4-[[[(cyclohexylamino) carbonyl] amino] sulfonyl] phényl] éthyl]-2-methoxybenzamide est représentée figure 7.

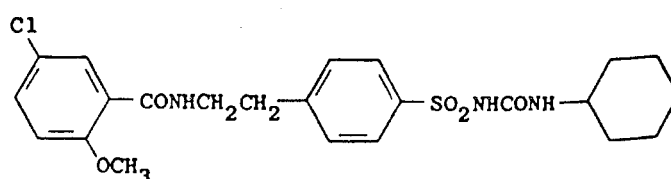


Figure 7 : Structure chimique du glibenclamide

2 - Propriétés pharmacologiques

Le glibenclamide est une sulfonylurée de deuxième génération couramment utilisée dans le traitement du diabète non-insulino dépendant. Cette molécule présente de nombreuses propriétés pharmacologiques, tant sur le plan vasculaire que sur le plan métabolique.

2 - 1 Glibenclamide et métabolisme glucidique

Au niveau des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, et dans des situations de déplétion cellulaire en ATP, le glibenclamide bloque les canaux potassiques ATP dépendants (Schmid-Antomachi et col., 1987), ce qui provoque une dépolarisation de la membrane et l'ouverture des canaux calciques de type L (Boyd et col., 1992). Le flux entrant de Ca^{2+} stimule la synthèse d'insuline qui permet ensuite la pénétration cellulaire de glucose. Par ce rôle normo-régulateur de la glycémie, le glibenclamide est une molécule largement utilisée dans le traitement du diabète insulino-dépendant.

2 - 2 Glibenclamide et muscle lisse vasculaire

Outre ses propriétés au niveau pancréatique, le glibenclamide agit également au niveau du muscle lisse vasculaire : il antagonise de façon compétitive l'effet vasorelaxant du cromakalim sur l'aorte thoracique et la veine portale de rat (Buckingham et col., 1989) et sur l'artère pulmonaire de cobaye (Eltze M., 1989). Par cette action, le glibenclamide pourrait favoriser la vasoconstriction en bloquant les canaux potassiques ATP dépendants impliqués dans la relaxation des muscles lisses vasculaires en réponse à de nombreux médiateurs vasodilatateurs dont l'adénosine (Nelson et Quayle, 1995). En bloquant les canaux potassiques ATP dépendants vasculaires, le glibenclamide crée une dépolarisation suivie d'une ouverture des canaux calciques de type L, ce qui entraîne une vasoconstriction. Cette hypothèse est confirmée par le fait que l'administration de dihydropyridines, des antagonistes des canaux calciques de type L, inhibe la vasoconstriction induite par le glibenclamide (Moreau et col., 1994). Du fait de son effet inhibiteur des canaux potassiques ATP dépendants, le glibenclamide est un outil pharmacologique largement utilisé.

Par ailleurs, le glibenclamide, administré à des rats conscients, diminue le flux artériel hépatique et augmente les résistances périphériques des territoires hépatique et portal (Moreau et col., 1994). Au contraire, l'administration intra-cérébrale de glibenclamide ne modifie pas le tonus vasculaire systémique et régional, ce qui prouve que la vasoconstriction observée avec le glibenclamide n'est pas due à un mécanisme central qui contrôlerait le système cardiovasculaire, mais bien à un effet du glibenclamide sur le muscle lisse vasculaire.

Enfin, administré à des patients diabétiques pendant 4 semaines, le glibenclamide diminue l'agrégation plaquettaire en réponse à l'adénosine et à l'adrénaline (Klauff et col., 1979). Par cette activité, le glibenclamide pourrait s'opposer au spasme vasculaire et à l'agrégation plaquettaire.

2 - 3 Glibenclamide et prostanoïdes

Le glibenclamide semble également interagir avec les prostanoïdes. En effet, le glibenclamide diminue la synthèse de TXA₂ (Florskowski et col., 1988), et, sur artères coronaires de chien, le glibenclamide se comporte comme un antagoniste compétitif du TXA₂ (Cocks et col., 1990).

Ces dernières propriétés renforcent l'hypothèse que le glibenclamide pourrait exercer un effet anti-spastique et anti-agrégant plaquettaire.

2 - 4 Glibenclamide et métabolisme lipidique

L'athérosclérose est la cause majeure de la morbidité et de la mortalité des patients diabétiques, et une hyperlipidémie ou une dyslipidémie est

fréquemment observée chez les diabétiques. Le traitement de patients diabétiques pendant 8 semaines par du glibenclamide entraîne une augmentation des HDL et une diminution des LDL et des triglycérides (Waysbort et col., 1988). Les LDL jouant un rôle majeur dans le risque d'occlusion coronarienne, spécialement chez les patients présentant un taux de cholestérol total élevé, la diminution du taux de LDL induite par 8 semaines de traitement par du glibenclamide pourrait contribuer au bénéfice clinique du traitement du diabète par du glibenclamide.

3 - Pharmacocinétique du glibenclamide

Le glibenclamide est une molécule lipophile, sa biodisponibilité après administration par voie orale est de 84 %. Les paramètres pharmacocinétiques du glibenclamide après administration en prise unique de 5 mg sont résumés tableau 2 :

Cmax (ng/ml)	200 à 300 soit 0,4 à 0,6 $\mu\text{M}/\text{ml}$
Tmax (h)	2 à 6
Css (ng/ml)	10 soit 0,02 $\mu\text{M}/\text{ml}$
T1/2 (h)	4 à 11
Vd (l)	9 à 10

Tableau 2 : Principaux paramètres pharmacocinétiques du glibenclamide après administration par voie orale, d'après Pearson et col. (1985).

Cmax = pic de concentration plasmatique, Tmax = temps nécessaire pour

atteindre le C_{max}, C_{ss} = concentration plasmatique à l'équilibre, T_{1/2} = demi-vie, V_d = volume de distribution

Cependant, dans les cas de diabète majeur, la posologie du glibenclamide peut atteindre 20 mg/jour, ce qui a pour conséquence une augmentation des taux plasmatiques de glibenclamide. Néanmoins, au delà de cette posologie, aucun gain d'efficacité n'a été démontré.

Le glibenclamide est métabolisé au niveau hépatique en 3 métabolites hydroxylés ; le cis-hydroxyglibenclamide et le trans-4-hydroxygliburide (Pearson et col., 1985). Par ailleurs, le glibenclamide est très fortement lié à la sérum-albumine humaine puisque son pourcentage de liaison est de 99 %. (Pearson et col., 1985).

Le glibenclamide, sulfonylurée de deuxième génération, actif pour des posologies de l'ordre du milligramme, est particulièrement intéressant pour la qualité de l'insulino-sécrétion qu'il entraîne. Cependant, le bénéfice clinique d'un traitement à long terme par du glibenclamide ne semble pas être dû à ses seules propriétés hypoglycémiantes puisque cette molécule semble également interagir avec le métabolisme des lipides et celui des prostanoïdes.

CHAPITRE III

PHARMACOLOGIE DU FUROSEMIDE

1 - Structure chimique du furosémide

La structure chimique du furosémide ou 5-(Aminosulfonyl)-4-chloro-2{(2-furanylméthyl)amino}benzoic acid est représentée figure 8.

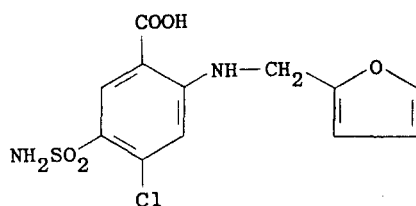


Figure 8 : Structure chimique du furosémide

2 - Propriétés pharmacologiques

Le furosémide est un puissant diurétique de l'anse de Henlé principalement utilisé dans l'hypertension artérielle essentielle et l'oedème aigu du poumon. Du fait de la multiplicité de ses mécanismes d'action potentiels, les propriétés pharmacologiques significatives du furosémide ne sont pas clairement établies et sont sujettes à controverse.

2 - 1 Effets rénaux du furosémide

Au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé, le furosémide bloque le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, ce qui conduit à une excrétion de Na^+ , et à une diurèse importante (Goodman et Gilman, 1985). Une déplétion volémique en résulte et entraîne une diminution des résistances périphériques systémiques.

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur du rein dans la relaxation induite par le furosémide.

Ainsi, Bourland et col. (1977) ont démontré que l'administration intraveineuse de furosémide à des chiens hypervolémiques induisait une diminution de la pression auriculaire gauche, et que cet effet était aboli par binéphrectomie, suggérant ainsi que l'effet vasodilatateur observé résultait d'une action du furosémide au niveau du rein. Des résultats similaires ont été observés chez l'homme : une augmentation de la capacitance veineuse survient après administration intraveineuse de 20 mg de furosémide chez des sujets sains soumis à un régime hypersodique, mais pas chez des patients anéphriques (Jonston et col., 1983). D'autres études réalisées sur des rats suggèrent que le furosémide induirait au niveau du néphron la synthèse d'une substance vasodilatatrice non prostanoïde, qui agirait au niveau de l'endothélium vasculaire et inhiberait la réponse sympathique vasoconstrictrice (Gerken et col., 1987). Une des explications de l'effet vasculaire du furosémide pourrait être la synthèse induite, via la synthèse de prostaglandines rénales, d'une substance vasodilatatrice (Gerken et col., 1987).

Par ailleurs, le furosémide est un inhibiteur de l'anhydrase carbonique, engendrant une excrétion urinaire de bicarbonates et de cations, sodium essentiellement (Goodman et Gilman, 1985).

2 - 2 Effets vasculaires du furosémide

En 1967, Biagi observa que l'administration de furosémide à un patient atteint d'un oedème aigu du poumon améliorait rapidement son état clinique et biologique, avant même l'apparition d'une diurèse, ce qui suggérait que l'effet vasodilatateur du furosémide n'était pas lié à son effet diurétique et donc qu'il pouvait agir directement sur le muscle lisse vasculaire.

Sur aorte de lapin, Kreye et col., (1981) ont également mis en évidence la présence de cotransporteurs $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$. En bloquant le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ vasculaire, le furosémide provoque une hyperpolarisation de membrane et donc une vasodilatation. Par ailleurs, Deth et col. (1987) ont observé, sur aorte isolée de rat, que le furosémide, à des concentrations supérieures à celles obtenues *in vivo* (10^{-3} M), inhibait la réponse contractile à la noradrénaline et exerçait donc un effet inhibiteur sur la vasoconstriction. D'autres études réalisées *in vitro* ont montré que le furosémide relâchait de 30 à 70 % plusieurs types de veines canines contractées au TXA_2 ou à la noradrénaline (Greenberg et col., 1994) ainsi que des artères pulmonaires de cobaye contractées à la noradrénaline (Stevens et col., 1992).

Des études cliniques ont confirmé que le furosémide pouvait exercer un effet vasodilatateur direct : Ikram et col. (1980) ont montré que l'injection intraveineuse de furosémide chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique provoquait en premier lieu une diminution de la pression artérielle pulmonaire, puis, dans un deuxième temps, une natriurèse, ce qui suggérait un effet vasodilatateur précoce du furosémide.

A l'inverse, le furosémide, à forte concentration, inhibe la $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, ce qui entraîne une dépolarisation et pourrait donc être

susceptible d'induire une vasoconstriction (Goodman et Gilman, 1985). De plus, l'administration de furosémide provoque l'activation du système rénine-angiotensine et la production d'angiotensine II vasculaire (Suzuki et col., 1995) dont l'effet pourrait être modulé par la production de prostaglandines vasodilatatrices (PGE₂, PGI₂).

2 - 3 Interaction du furosémide avec les prostaglandines

L'interaction du furosémide avec les prostaglandines a été proposée pour expliquer certains effets vasculaires et rénaux du furosémide.

Miyanoshita et col. (1989) ont mis en évidence chez le rat que l'administration de furosémide entraînait une production dose dépendante de PGE₂, secondaire à une augmentation de la libération d'acide arachidonique au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé. La PGE₂ étant une prostaglandine vasodilatatrice, elle entraîne une dilatation des artères rénales, augmente le flux rénal et donc la diurèse. Il semblerait que cet effet soit caractéristique des diurétiques de l'anse de Henlé puisque la même production de PGE₂ a été observée avec le bumétamide. Cette augmentation de PGE₂ peut être expliquée par l'inhibition de l'enzyme de dégradation de la PGE₂, la PGE₂ 9-ketoréductase, ou par la stimulation du relargage d'acide arachidonique (Weber et col., 1977).

D'autres études réalisées chez le lapin (Katayama et col., 1984) ont confirmé ce fait : l'administration de furosémide induit la synthèse de PGE₂, une augmentation de la natriurèse et de l'excrétion urinaire de PGE₂. D'autre part, l'effet natriurétique du furosémide est inhibé par l'indométhacine chez le chien (Lundergan et col., 1988), le cheval (Hinchcliff et col., 1995) et l'homme (Patak et col., 1975).

Bourland et col. (1977) ont aussi démontré chez le chien que l'effet veinodilatateur du furosémide pouvait être inhibé par un traitement par l'indométhacine. D'autre plus, la prémédication de chevaux par de la phénylbutazone altère de façon différentielle les effets hémodynamiques systémiques et les effets diurétiques du furosémide (Hinchcliff et col., 1995). Ainsi, l'administration intraveineuse de phénylbutazone atténue l'effet diurétique du furosémide et abolit la diminution du rythme cardiaque, de la pression ventriculaire droite et des résistances périphériques qui surviennent précocement après l'administration de furosémide. Enfin, sur un modèle de lobe pulmonaire isolé de chien, Lundergan et col. (1988) ont décrit une diminution de la pression de l'artère pulmonaire, sans doute médiée par des prostaglandines car abolie par l'addition d'indométhacine. Ces auteurs en déduisent que le furosémide stimule la synthèse de prostacycline, ou, du moins, exerce un effet vasodilatateur identique à celui de la prostacycline.

Les résultats de ces nombreuses études mettent en évidence le rôle important des prostanoïdes dans les mécanismes d'action du furosémide, tant pour ses effets natriurétiques que vasodilatateurs.

2 - 4 Effets pulmonaires du furosémide

Nébulisé au niveau des voies aériennes supérieures chez des sujets sains (Polosa et col., 1995) ou des asthmatiques (Pavord et col., 1992), le furosémide inhibe la bronchoconstriction induite par l'exercice ou l'inhalation de méthacholine, et cet effet bronchoprotecteur est aboli par l'administration préalable d'indométhacine. Ces études cliniques suggèrent donc que l'effet bronchoprotecteur du furosémide est dû à la stimulation de la synthèse de prostaglandines bronchodilatatrices.

Cette hypothèse a été confirmée par des études réalisées *in vitro* : sur des

anneaux de bronches humaines sensibilisées avec le sérum d'un donneur atopique, le furosémide entraîne une augmentation de la production de PGE₂, effet également inhibé par l'indométhacine (Pavord et col., 1992).

De plus, Anderson et col. (1991) ont démontré, sur anneaux bronchiques de sujets sensibilisés avec un allergène, que le furosémide, dans une gamme de concentrations retrouvées après administration de doses thérapeutiques de furosémide, inhibait le relargage d'histamine et de leucotriènes par les mastocytes de poumon.

De récentes études réalisées sur anneaux bronchiques humains ont mis en évidence que le furosémide inhibait la réponse contractile à la bradykinine, et qu'il se comportait comme un antagoniste compétitif du TXA₂ (Molimard et col., 1995).

Enfin, sur trachée de cobaye, Elwood (1991) ont montré que le furosémide inhibait la neurotransmission de l'acétylcholine et du système NANC (Non Adrénergique Non Cholinergique) excitateur.

Ces nombreuses études suggèrent que le furosémide, nébullisé au niveau des voies aériennes supérieures, entraîne un effet bronchoprotecteur, en interagissant localement avec les cellules de l'inflammation et avec les prostanoïdes.

3 - Propriétés pharmacocinétiques

Le furosémide est une molécule lipophile, sa biodisponibilité après administration par voie orale est de 71 %. *In vivo*, le furosémide est lié à plus de 98 % aux protéines plasmatiques (Andreaen et col., 1988).

Les paramètres pharmacocinétiques du furosémide après administration unique de 40 mg par voie orale, ou de 20 mg par voie intraveineuse, sont

résumés tableau 3 :

paramètres	Administration orale	Administration intraveineuse
C _{max} (μM/ml)	4,2 ± 1,8	6,3 ± 1,8
t _{max} (h)	2,4 ± 2,5	0,6 ± 0,2
AUC (hr.μg/ml)	4,3 ± 2,4	3,2 ± 1,9
T _{1/2}	1,7 ± 0,9	1,5 ± 0,3

Tableau 3 : Principaux paramètres pharmacocinétiques du furosémide après administration par voie orale ou intraveineuse, d'après Andreasen et col. (1988) et Benet et col. (1979).

C_{max} = pic de concentration plasmatique, T_{max} = temps nécessaire pour atteindre le C_{max}, C_{ss} = concentration plasmatique à l'équilibre, T_{1/2} = demi-vie, V_d = volume de distribution

De plus, une étude pharmacocinétique réalisée par Vargo et col., (1995) n'a révélé aucune différence concernant les paramètres pharmacocinétiques du furosémide chez des sujets sains ou chez des sujets en état d'insuffisance cardiaque congestive.

En conclusion, le furosémide, molécule largement utilisée dans le traitement de l'hypertension artérielle, de l'insuffisance cardiaque et de l'œdème pulmonaire, semble agir non seulement au niveau du néphron, où il entraîne une importante diurèse, mais également au niveau du muscle lisse vasculaire, où il exerce un effet vasodilateur, soit direct, soit médié par les prostaglandines.

Partie Expérimentale

PARTIE EXPÉRIMENTALE

INTRODUCTION

L'analyse de la littérature précédemment réalisée a mis en exergue le rôle majeur du thromboxane A₂ (TXA₂) dans la vasoconstriction et l'agrégation plaquettaires, et par conséquent dans l'étiopathogénie de nombreuses situations pathologiques, notamment cardiaques et/ou vasculaires.

Nous venons également de démontrer que le furosémide et le glibenclamide exerçaient tous deux des effets vasculaires et interagissaient, dans leur mécanisme d'action, avec le thromboxane A₂.

Le TXA₂ étant un des plus puissants médiateurs endogènes de l'agrégation plaquettaire et du spasme vasculaire, nous avons testé *in vitro*, les propriétés inhibitrices du glibenclamide et du furosémide, sur la contraction de deux préparations de muscles lisses vasculaires humains induite par le TXA₂.

Nous avons réalisé cette étude sur un modèle de cuve à organe isolé. Ce modèle présente l'intérêt de travailler sur un système cellulaire complet, dans lequel l'intégrité du système de transduction - à savoir récepteur membranaire, protéine G, second messenger et protéines effectrices - est préservée. Ce système présente également l'avantage d'avoir un contrôle des concentrations obtenues *in vitro*, condition indispensable pour mettre en évidence des propriétés antagonistes. Cependant, ce modèle présente des limites : un vaisseau isolé n'est pas perfusé par du sang, et risque d'être altéré par le montage.

A notre connaissance, aucune investigation n'a été menée à ce jour dans le but de mettre en évidence des propriétés antagonistes du glibenclamide et du

furosémide vis-à-vis du TXA₂ sur vaisseaux humains. L'objectif de notre étude a été de tester, sur artères mammaires internes et veines saphènes, l'activité du glibenclamide et du furosémide sur la contraction provoquée par un analogue stable du TXA₂, l'U-46619 (Coleman et col., 1981).

MATERIELS ET METHODES

1 - Préparation des tissus

1 - 1 Artères mammaires internes (AMI)

1 - 1 - 1 Origine et préparation des AMI

Les artères mammaires (AMI) provenaient de patients opérés pour pontage aorto-coronarien dans le service de chirurgie cardiaque du C. H. U. de Grenoble. Les segments artériels inutilisés pour le pontage étaient immédiatement placés dans des flacons contenant de la solution physiologique de Krebs oxygénée et maintenus à +4 °C, puis transférés au laboratoire de pharmacologie. Dans un délai maximum de 24 heures, les artères étaient isolées de leurs veines, des tissus conjonctifs, graisseux, musculaires et fibreux en prenant soin de préserver les cellules musculaires lisses et l'endothélium intacts, puis découpées en anneaux de 3 mm de long.

Les anneaux vasculaires ont été montés entre deux crochets d'acier inoxydable dans une cuve à organe isolé de 10 ml, le crochet supérieur étant relié à un micromètre (Mitutoyo), et le crochet inférieur à un transducteur (UF-1 Pioden).

Une cuve à organe isolé est représentée par la figure 9.

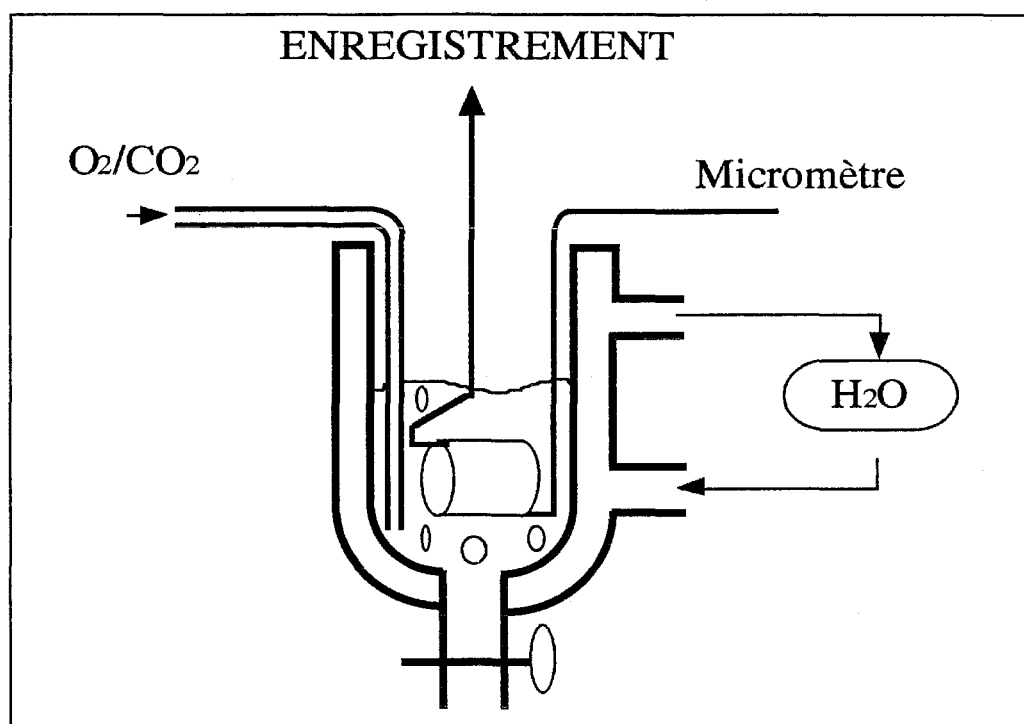


Figure 9 : Représentation schématique d'une cuve à organe isolé. Le micromètre, relié à la tige inférieure, permet une mesure précise du diamètre interne de l'anneau artériel, nécessaire pour établir l'étape suivante de normalisation de la tension de base.

1 - 1 - 2 Mise en tension des anneaux artériels

Le diamètre des anneaux artériels variant d'un patient à l'autre et selon le niveau de section (plus ou moins distal) de l'artère, les diamètres artériels à l'état de repos étaient différents. Une procédure de normalisation de la tension

de base appliquée à chaque vaisseau a été nécessaire pour standardiser la tension de repos des différents segments. Décrite dans de précédents travaux (He et col., 1989a, Chardigny et col., 1994), cette normalisation a consisté à déterminer la circonférence de chaque vaisseau soumis à une pression intramurale de 100 mm de Hg. La tension appliquée à chaque vaisseau devait être équivalente à la tension nécessaire pour imposer au vaisseau une circonférence égale à 90 % de la circonférence obtenue sous une tension transmurale de 100 mm de Hg. Pour cela, une courbe diamètre-tension a été construite pour chaque anneau artériel en séparant les deux étriers par pallier de 2,5 g d'étirement, la référence zéro étant obtenue lorsque les deux tiges se touchaient. Une illustration de la procédure de mise en tension des anneaux artériels est présentée par la figure 10.



Figure 10 : Exemple de détermination pratique d'une courbe de normalisation sur un anneau d'AMI. Chaque palier correspond à un incrément de tension de 2,5 g pour lequel est lu, sur le micromètre, le diamètre interne, permettant ainsi d'établir la courbe diamètre interne-tension pour chaque anneau artériel.

Une droite était ensuite déterminée représentant la tension en fonction du diamètre pour une pression constante de 13,3 KPa. L'intersection de cette droite et des courbes diamètre-tension permettait d'obtenir le diamètre D100 correspondant à une pression transmurale de 100 mm de Hg. L'artère était alors relâchée à un diamètre de 0,9 D100 et maintenue à ce niveau pour le reste de l'expérience.

Un exemple théorique d'une courbe diamètre-tension permettant la détermination de la tension de repos à imposer à chaque anneau artériel est représenté par la figure 11.

tension (g)

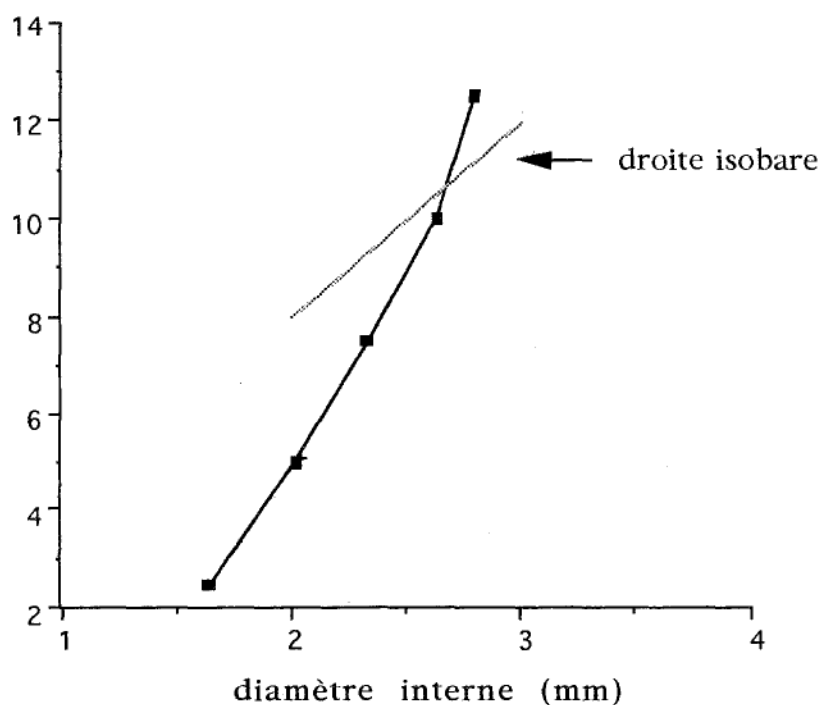


Figure 11 : Exemple pratique d'une courbe diamètre-tension permettant la détermination de la tension de repos à imposer à chaque anneau artériel. L'intersection de la courbe avec la droite isobare, qui est une fonction du

diamètre artériel pour une pression transmurale de 100 mm de Hg, permet de déterminer le diamètre artériel pour une pression transmurale de 100 mm de Hg ou D100.

Cette tension de repos normalisée était donc obtenue pour chaque vaisseau d'après sa propre courbe de tension-longueur. Le diamètre 0,9 D100, quelque peu arbitraire, a été fixé d'après des travaux antérieurs démontrant chez le rat que la tension active maximale était développée lorsque les vaisseaux étaient tendus à 0,9 D100 (Mulvany et al., 1977). Les calculs étaient réalisés pour chaque palier de façon à ne pas exercer une tension excessive sur les anneaux artériels.

Cette procédure est importante car elle permet de comparer entre eux des anneaux artériels issus de la section du vaisseau à des niveaux plus ou moins distaux, et donc de diamètre différent à l'état de repos. Cette méthode de normalisation permet aussi d'interpréter les variations de tension indépendamment du diamètre du vaisseau étudié.

Après 1 heure d'équilibration dans le liquide de Krebs oxygéné et thermostaté à 37 °C, les AMI ont été contractées par $3 \cdot 10^{-5}$ M de noradrénaline, puis relâchées par 10^{-3} M de nitroprussiate de sodium. Dans ces conditions, les réponses étaient reproductibles pendant plusieurs heures.

1 - 2 Veines saphènes humaines

1 -2 -1 Origine et préparation des veines saphènes

Les veines saphènes (VS) provenaient de patients opérés pour éveilage ou pontage fémoro-poplité dans le service de chirurgie vasculaire du C. H. U. de

Grenoble.

Une fois prélevés, les vaisseaux ont été immédiatement placés dans des flacons contenant du liquide physiologique de Krebs oxygéné, et maintenus à +4°C, puis transférés et utilisés au laboratoire de pharmacologie dans un délai maximum de 24 heures. Par dissection, les vaisseaux ont été libérés de la graisse et des tissus conjonctifs adhérents et découpés en anneaux de 4 mm de long, en prenant soin de préserver la paroi musculaire intacte. Les anneaux étaient montés dans des chambres à organe isolé contenant 5 ml de solution de Krebs continuellement oxygénée par du carbogène (95 % O₂ et 5 % CO₂) et maintenue à 37 °C.

1 - 2 - 2 Mise en tension des anneaux veineux

Une tension de 2 grammes était imposée aux préparations par un système de mise en tension passive entre un point d'ancrage fixe et un étrier fixé sur le capteur, et déplacé par une crémaillère micrométrique. Cette tension de 2 g a été déterminée par des études préliminaires réalisées dans le laboratoire.

Après une heure d'équilibration pendant laquelle le liquide de Krebs était renouvelé toutes les 15 minutes, les veines étaient contractées par 10⁻⁴ M de sérotonine, puis relâchées par 10⁻³ M de nitroprussiate de sodium, afin d'obtenir une réponse expérimentale reproductible pendant plusieurs heures.

Après cette stimulation initiale, une période d'équilibration de 1 heure, entrecoupée de lavages toutes les 15 minutes, était imposée aux veines.

La tension isométrique développée par les anneaux vasculaires 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).

2 - Méthodologie

Après la phase de mise en tension des anneaux vasculaires, du glibenclamide à 3, 10, ou 30 μM , ou son véhicule (le méthanol) a été ajouté dans les cuves. Chaque anneau a été traité par une seule concentration de glibenclamide ou par son solvant, le méthanol. Après une période d'incubation de 30 à 40 minutes, des concentrations croissantes de TXA_2 (10^{-10} à 10^{-5} M) ont été ajoutées de façon cumulative, par incrémentation semi logarithmique, au plateau de la contraction provoquée par la concentration inférieure de TXA_2 . Pour chaque série d'expériences, la réponse aux mêmes concentrations de TXA_2 était enregistrée sur un anneau témoin non exposé au méthanol, ni au glibenclamide.

La même méthode a été utilisée pour le furosémide en employant des concentrations de 10^{-4} , 2.10^{-4} , 3.10^{-4} , et 10^{-3} M de furosémide, la période d'incubation avec l'antagoniste étant d'une heure.

Dans une autre série d'expériences, les AMI et VS ont été pré-traitées par 10^{-6} M d'indométhacine, 15 minutes avant l'addition de furosémide, afin d'évaluer l'impact des prostaglandines dans l'effet inhibiteur du furosémide, sur la contraction à l'U-46619.

D'autres investigations ont consisté à réaliser sur AMI des courbes concentration/contraction à la noradrénaline (10^{-9} à 3.10^{-5} M) et à l'endothéline (10^{-9} à 3.10^{-5} M) et des courbes concentration/contraction à la sérotonine (5-HT) sur VS, après ou sans pré-traitement des AMI et des VS par 10^{-3} M de furosémide, ou 30 μM de glibenclamide. Ces expériences permettaient d'étudier la sélectivité d'action du glibenclamide et du furosémide vis-à-vis du récepteur TP.

Dans une cinquième série d'expériences, nous avons étudié la

contraction des AMI et des VS à l'U-46619 en présence d'un antagoniste très spécifique et sélectif des récepteurs TP, le GR32191, afin de pouvoir comparer l'antagonisme du glibenclamide et du furosémide à un antagoniste de référence dont les effets sur muscles lisses vasculaires humains sont connus (Lumley et col., 1989, He et col., 1995).

Enfin, pour étudier leurs effets sur le tonus de base des vaisseaux, 30 μ M de glibenclamide, 10^{-6} M d'indométhacine puis 10^{-3} M de furosémide ont été ajoutés dans la cuve à organe isolé, une fois la période d'équilibration des vaisseaux achevée. La relaxation maximale des vaisseaux a été obtenue par l'addition de 3.10^{-4} M de papavérine.

3 - Expression des résultats

Les contractions au TXA₂ des veines saphènes humaines ont été exprimées en pourcentage de contraction par rapport à la sérotonine ajoutée à une concentration de 10^{-4} M à la fin de la courbe concentrations cumulées-contraction au TXA₂. La sérotonine a été choisie comme standard interne car c'est un agent vasoconstricteur plus puissant que le TXA₂ sur veines saphènes humaines (Schilling et col., 1995).

Pour les AMI, la normalisation a été effectuée par rapport à 3.10^{-5} M de noradrénaline ajoutée à la fin de la courbe d'agoniste, la noradrénaline étant également un des plus puissants vasoconstricteurs sur AMI (He et col., 1989).

Du fait de la variabilité de la force développée par les anneaux vasculaires et de la quantité parfois insuffisante de tissu humain disponible pour tester toutes les concentrations de glibenclamide ou de furosémide, une standardisation des résultats était nécessaire. L'expression en pourcentage de

contraction par rapport à un standard interne -la noradrénaline pour les AMI et la 5-HT pour les VS - a permis de réaliser l'analyse et la représentation graphique des résultats.

L'effet du glibenclamide, du furosémide et de l'indométhacine sur le tonus de base des vaisseaux est exprimé en pourcentage par rapport à la relaxation totale obtenue par la papavérine à 3.10^{-4} M

Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations finales obtenues dans la cuve à organe isolé.

4 - Analyse statistique des résultats

Les résultats exprimés sont des résultats moyens $\pm$ les écarts types à la moyenne. Pour chaque courbe dose-effet, la EC50 (concentration qui provoque la moitié de la contraction maximale) et le Emax (effet maximum ou contraction maximale) ont été déterminés. Une représentation schématique d'une courbe effet-dose et de la détermination graphique de l'Emax et de l'EC 50 est proposée par la figure 12 :

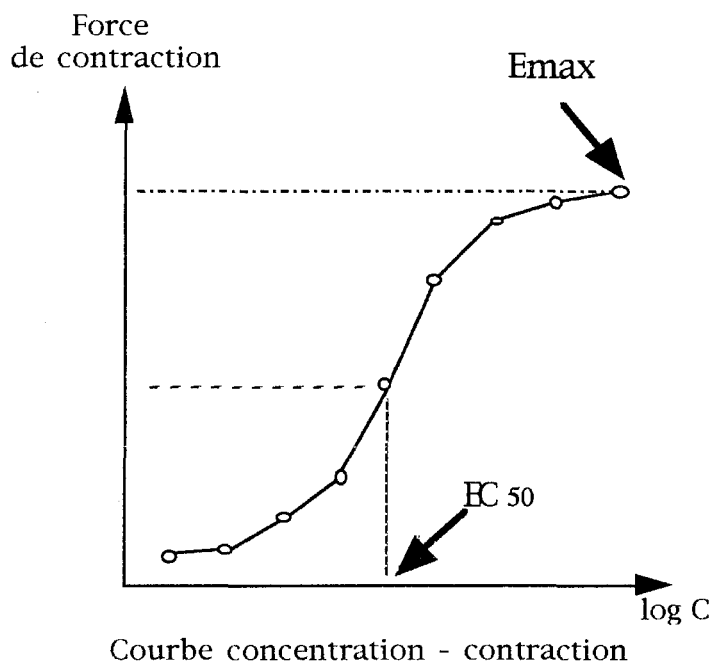


Figure 12 : Représentation schématique d'une courbe effet-dose et de la détermination graphique de l'Emax et de l'EC 50

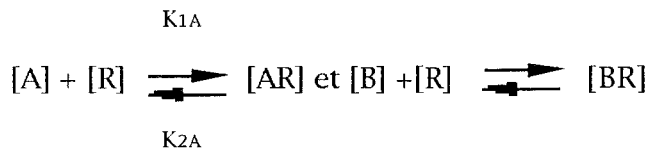
Les EC50 moyennes du témoin et celles obtenues en présence des différentes concentrations d'antagoniste ont été comparées par un test de Student bilatéral en séries non appariées. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives pour des valeurs de $p < 0,05$.

Le pD_2 (logarithme négatif de l'EC50) moyen de chaque courbe, obtenu en présence ou en l'absence d'antagoniste, a été utilisé pour comparer la puissance du TXA₂ en présence ou en l'absence de glibenclamide ou de furosémide. Le pD_2 est le reflet de la puissance d'un agoniste pour un type de récepteur donné et permet de comparer entre eux différents agonistes.

L'étude de l'affinité d'un récepteur pour un antagoniste s'effectue selon l'analyse de Schild (Arunlakshana et Schild, 1959). Une démonstration et une explication du principe de l'analyse de Schild ont été proposées par Bertrand et

Landry (1989) :

Si(A) = concentration de l'agoniste, (B) = la concentration de l'antagoniste et (R) = la concentration en récepteur, l'interaction d'un agoniste et d'un antagoniste compétitif avec leur récepteur étant régi selon la loi d'action de masse, les réactions peuvent s'écrire de la façon suivante :



La population totale des récepteurs est donnée par la relation :

$$[R_t] = [R] + [AR] + [BR]$$

A l'état d'équilibre, on aura :

$$K_{1A} \cdot [A] ([R_t] - [AR] - [BR]) = K_{2A} \cdot [AR]$$

$$\text{d'où } [BR]/[R_t] = 1 + (AR/[R_t] (1 + K_{DA}/[A]))$$

avec K_{DA} = constante de dissociation de l'agoniste.

Une équation identique est obtenue avec l'antagoniste B

$$K_{DB}/[B] = [AR]/[R_t] (1 + K_{DA}/[A])(1 + K_{DB}/[B] - 1).$$

avec K_{DB} = constante de dissociation de l'antagoniste.

Un réarrangement de cette équation conduit à

$$[AR]/[R_t] = [A]/[A] + K_{DA} (1 + [B]/K_{DB}).$$

Cette équation donne la fraction du récepteur occupée par l'agoniste $[AR]/[R_t]$ en présence de toutes les concentrations données d'agoniste et d'antagoniste. En considérant qu'une même réponse est due aux mêmes conditions d'occupation du récepteur par l'agoniste, on définit le rapport de dose, ou dose ratio, par :

$$\text{dose ratio ou ratio de concentration } [CR] = [A']/[A]$$

où $[A']$ = concentration d'agoniste nécessaire en présence d'antagoniste

$[A]$ = concentration équi-active en l'absence d'antagoniste.

La relation ci-dessus peut s'écrire $\log (CR-1) = \log [B] - \log K_{DB}$.

La représentation graphique de $\log (CR-1)$ en fonction de $\log [B]$ est appelée

représentation graphique de l'analyse de Schild. Elle permet de calculer l'affinité du récepteur pour l'antagoniste, et d'approcher la nature de l'antagonisme, compétitif ou non. En effet, si la pente de la droite est égale à l'unité, un antagonisme compétitif peut être proposé. Si la pente est différente de un, l'antagonisme est considéré comme non compétitif (Arunlakshana et Schild, 1959).

L'intersection de la droite de Schild avec l'axe des abscisses, c'est-à-dire lorsque $\log (\text{dose ratio} - 1) = 0$, soit $\text{dose ratio} = 2$, correspond au logarithme négatif de la constante de dissociation des antagonistes compétitifs si la pente de la droite est égale à un. Cette valeur est dénommée pA_2 et correspond au logarithme changé de signe de la concentration molaire d'antagoniste qui nécessite le doublement de la concentration d'agoniste pour obtenir le même effet qu'en l'absence d'antagoniste, autrement dit un ratio de 2.

Ce pA_2 présente l'intérêt d'être caractéristique du récepteur considéré, et il est théoriquement indépendant de l'agoniste utilisé.

Une représentation schématique de la détermination graphique du pA_2 est présentée par la figure 13 :

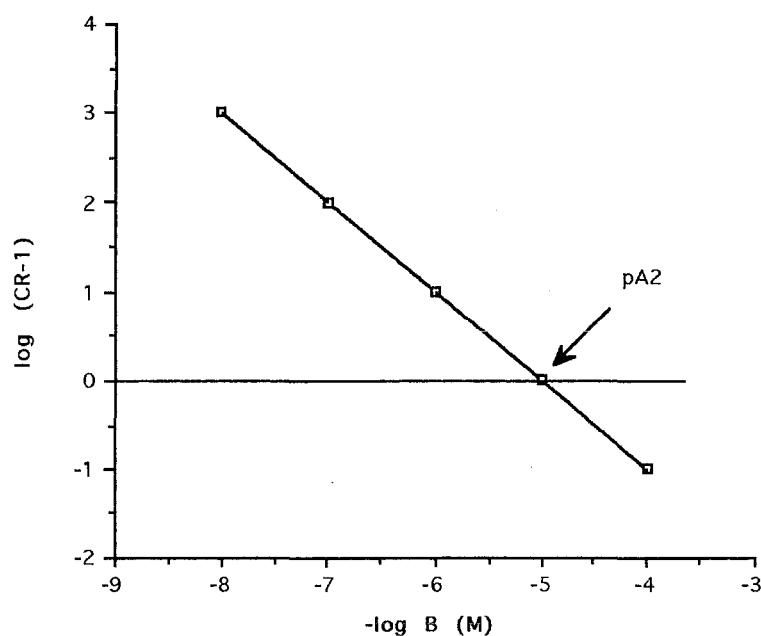


Figure 13 : Représentation graphique de la régression linéaire de l'analyse de Schild. L'intersection de la droite avec l'axe des abscisses permet de déterminer le pA_2 .

Dans notre étude, le ratio de concentration (CR) a été déterminé en divisant l'EC50 de l'U-46619 obtenu en présence de glibenclamide ou de furosémide, par l'EC50 de l'U-46619 nécessaire pour produire la même réponse que celle obtenue en l'absence d'antagoniste mais en présence du véhicule du glibenclamide ou du furosémide.

Pour chaque série d'expérience, le pA_2 et la pente de la régression linéaire ont été calculés. Les pentes de la régression linéaire obtenues, non statistiquement différentes de l'unité, suggèrent une interaction compétitive entre la drogue et le récepteur.

5 - Produits et réactifs

Les produits utilisés et leur provenance ont été : le glibenclamide (Natick, USA), le furosémide (Hoechst, Allemagne), l'analogue stable du TXA₂, l'U46619 (9,11 - Dihydroxy-11, 9 - epoxy - methanoprostaglandin F₂), le nitroprussiate de sodium (Sodium Nitroferricyanide), la sérotonine (5 hydroxytryptamine hydrochloride), l'indométhacine (Sigma, France), l'endothéline (Zeneca, Royaume Uni), le GR32191 (Glaxo, Royaume Uni) ; la noradrénaline a été obtenue auprès de la pharmacie du CHU.

Les solutions de l'analogue du TXA₂ à 10⁻⁴ M, de sérotonine à 10⁻⁴ M, de nitroprussiate de sodium à 10⁻³ M, d'endothéline à 10⁻⁵ M et de GR32191 à 3.10⁻⁵ M ont été préparées dans de l'eau distillée.

Le glibenclamide a été solubilisé dans du méthanol à une concentration de 3.10⁻³ M, le furosémide a été solubilisé dans un mélange eau/méthanol (0,1 : 0,9, v/v) à une concentration de 10⁻⁴ M.

Toutes ces solutions ont été stockées à -20 °C. Pour chaque expérience, une gamme de concentrations a été préparée extemporanément dans de l'eau distillée.

La solution de Krebs a été préparée avec des produits Prolabo Normapur et préparée extemporanément avant chaque expérience. Sa composition était la suivante : NaCl (47 mM), KCl (1,8 mM), CaCl₂ (1,2 mM), MgSO₄ (0,4 mM), KH₂PO₄ (0,4 mM), glucose (11 mM), NaHCO₃ (25 mM).

RÉSULTATS

1 - Relation diamètre-tension des AMI

Cent soixante trois anneaux d'AMI ont été utilisés pour cette étude. Ces chiffres représentent 60 % de l'ensemble des anneaux, les 40 % restant n'ont pas été analysables, soit par l'absence de réactivité, soit par l'absence d'obtention de plateau de contraction stable au TXA₂, à la noradrénaline, ou à l'endothéline.

Concernant les courbes de normalisation, quatre vingt dix neuf données ont été recueillies pour les AMI. Le diamètre interne moyen des segments artériels à un équivalent de pression transmurale de 100 mmHg était de 1,617 +/- 0,083 mm (n=99). Lorsque les segments artériels mammaires internes étaient relâchés à 0,9 D100, la pression transmurale équivalente était de 80,5 mmHg et la force développée de 5,428 g.

En ce qui concerne les veines saphènes, 148 anneaux veineux ont été montés. Seuls ceux qui présentaient une contraction au KCl lors de la stimulation initiale étaient analysés, ce qui représente 58 % des anneaux montés.

2 - Effets du glibenclamide

2 - 1 Effet du glibenclamide sur le tonus de base des AMI et VS

L'addition de glibenclamide sur les préparations musculaires lisses a provoqué une relaxation moyenne sur le tonus de base de $13,8 \pm 2,4$ % sur les VS, et de $15,1 \pm 4,1$ sur les AMI, par rapport à la relaxation totale obtenue par 3.10^{-4} M de papavérine.

2-2 Effet du glibenclamide sur la contraction à l'U-46619 des AMI ET VS

L'augmentation progressive des concentrations de glibenclamide (3, 10 et 30 μ M) a entraîné un déplacement vers la droite des courbes de contraction à l'U-46619, sans altérer son efficacité (E_{max}), tant sur les AMI (Figure 14 a) que sur les veines saphènes (Figure 14 b). L'analyse de Schild de l'effet du glibenclamide sur l'analogue stable du TXA₂ révèle un pA_2 égal à $6,3 \pm 0,4$ M (pente de la régression linéaire : $1,0 \pm 0,3$; $p = 0,93$) pour les AMI (Figure 15 a) et un pA_2 égal à $6,5 \pm 0,8$ M (pente de la régression linéaire : $1,4 \pm 0,2$; $p = 0,061$) pour les VS (Figure 15 b). L'incubation préalable du méthanol au 1/100 ème ne modifie pas de façon significative la réponse contractile des AMI (Figure 16 a) et des VS (Figure 16 b) à l'U-46619.

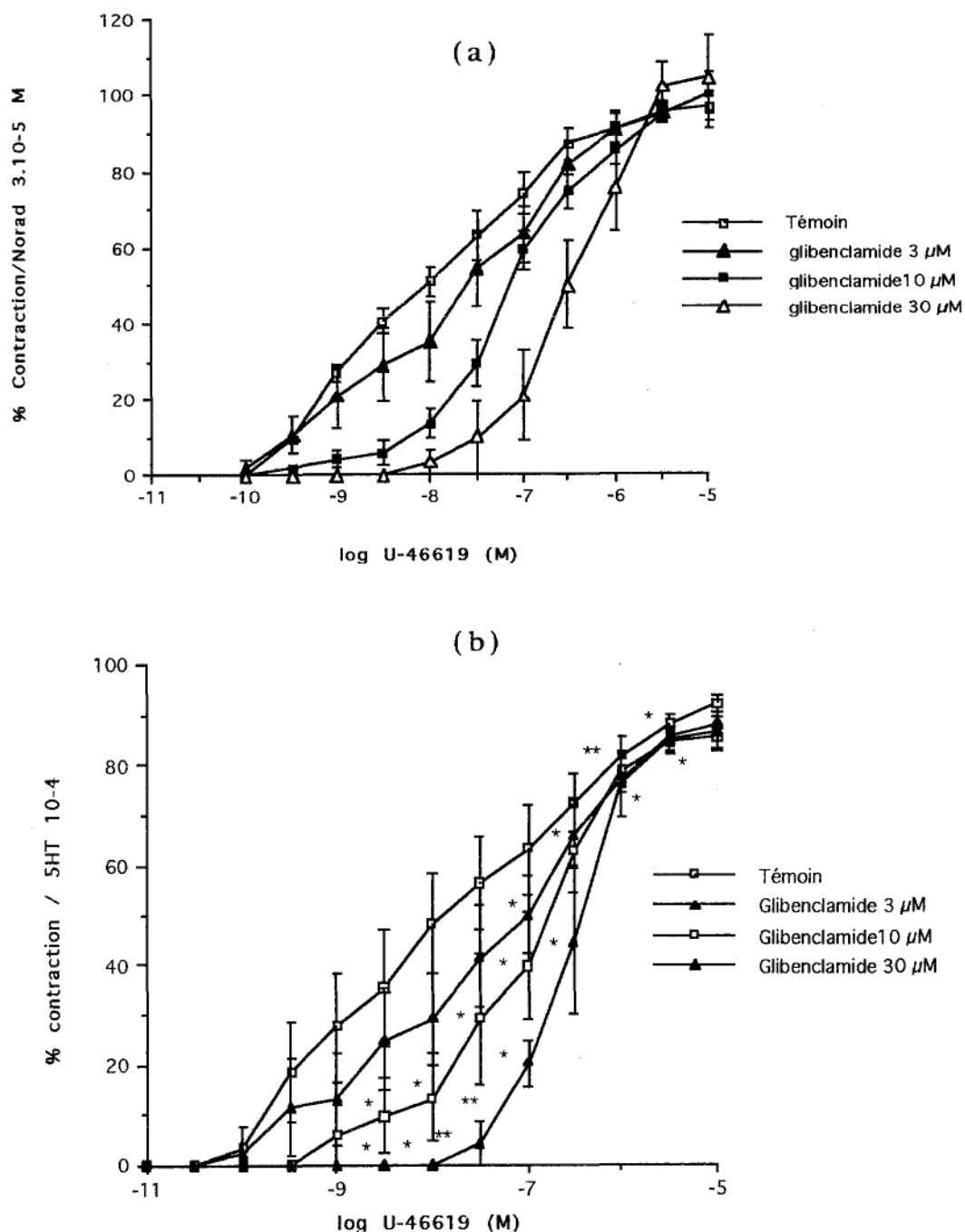


Figure 14 : Courbes cumulatives concentration/contraction à l'U-46619 sur AMI (a) et VS (b) en l'absence et en présence de 3, 10 et 30 μ M de glibenclamide. Les valeurs représentent les moyennes de 7 ou 8 expériences. Les barres verticales représentent les erreurs standards à la moyenne. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$

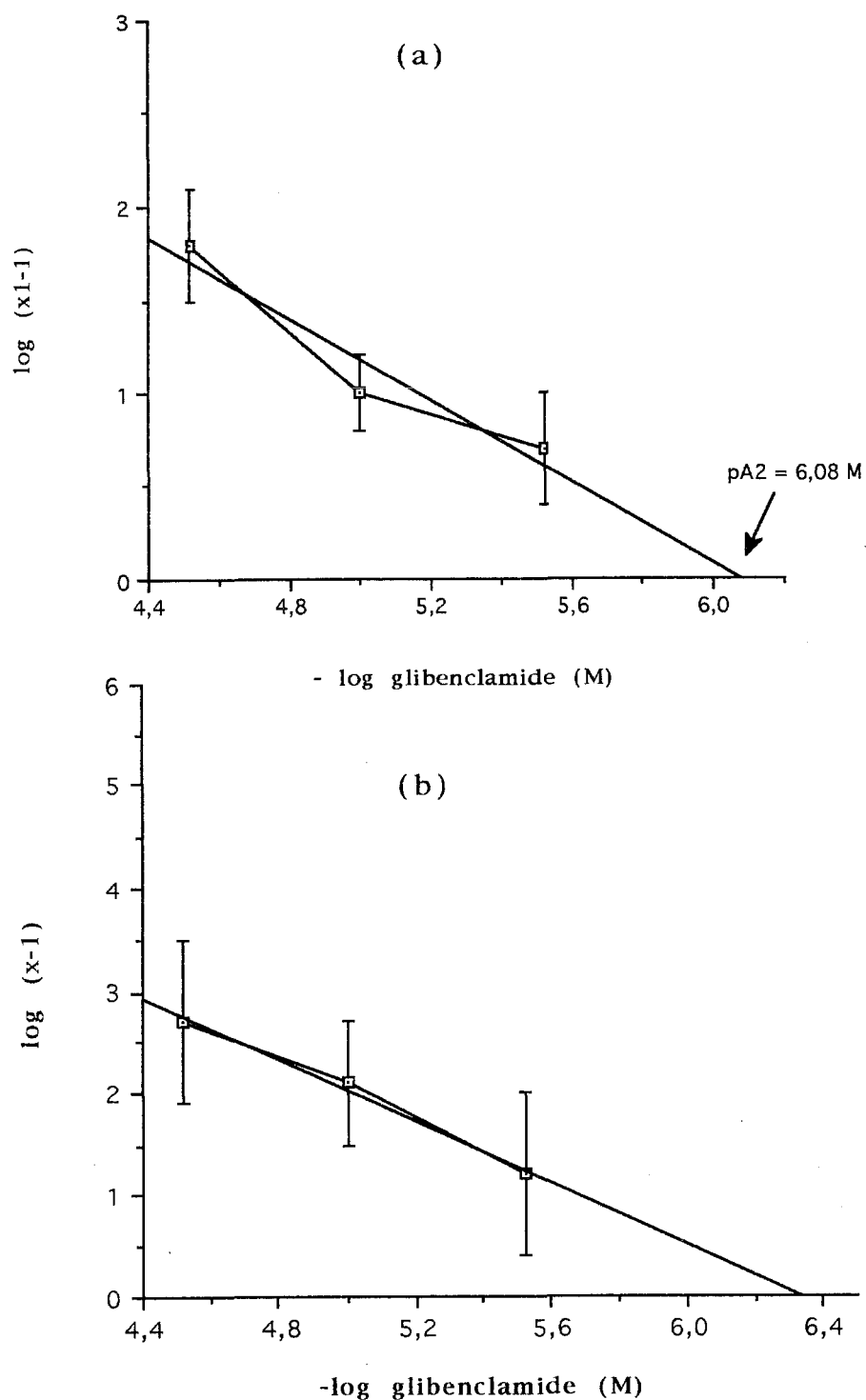


Figure 15 : Représentation graphique de l'effet antagoniste du glibenclamide vis-à-vis de l'U-46619, sur AMI (a) et VS (b), selon l'analyse de Schild. La droite est la régression de 6 ou 7 expériences pour chaque concentration de glibenclamide. Les symboles représentent la moyenne $\pm$ les écarts types.

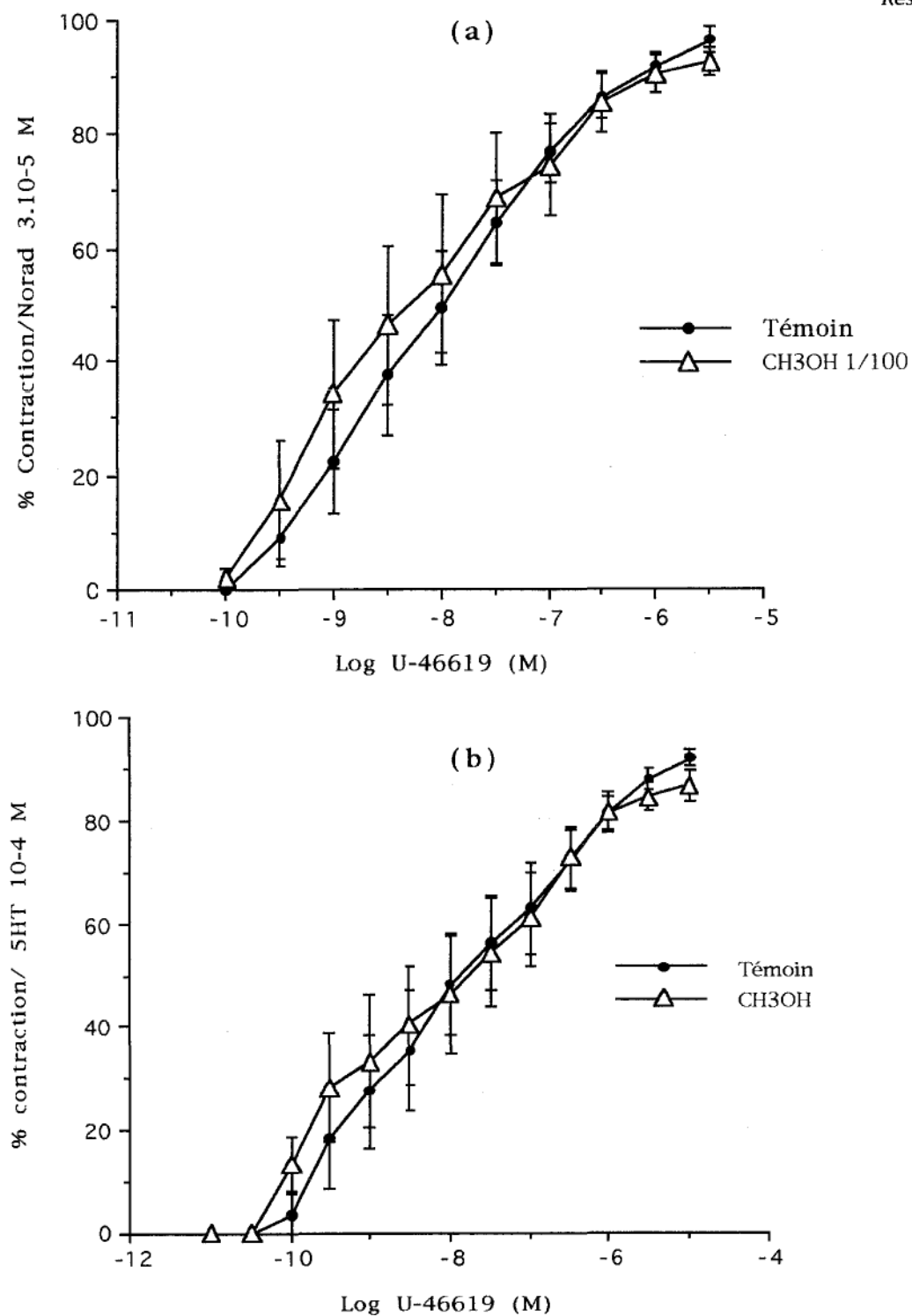


Figure 16 : Courbes cumulatives concentration/contraction des AMI (a) et des VS (b) à l'U-46619 en présence de méthanol au 1/100ème ($n = 6$ à 8 pour chaque condition d'expérience). Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence

2 - 3 Effet du glibenclamide sur la contraction à la noradrénaline et à l'endothéline des AMI, et sur la contraction à la 5-HT des VS

Le glibenclamide 30 μ M ne modifie pas statistiquement la réponse contractile des VS à la 5-HT (Figure 17), aussi bien en terme de pD₂ que de E_{max} (Tableau 4). Il en est de même pour l'effet du glibenclamide 30 μ M sur la réponse des AMI à la noradrénaline (Figure 18 a) et à l'endothéline (Figure 18 b, Tableau 4).

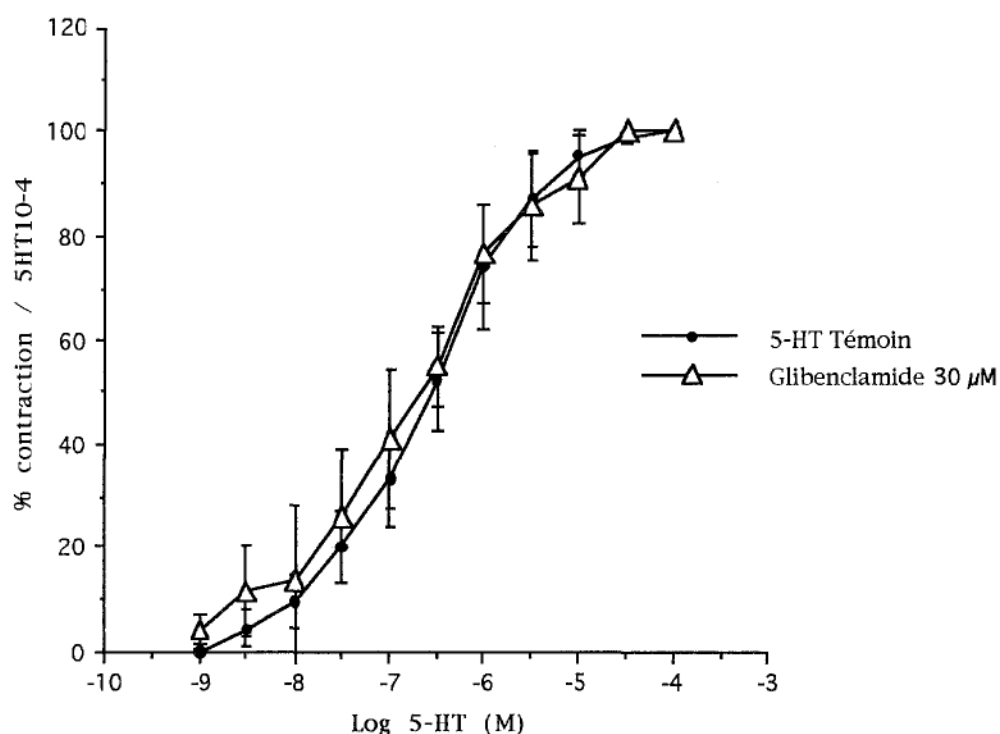


Figure 17 : courbes cumulatives concentration/contraction des VS à la 5-HT en l'absence ou en présence de 30 μ M de glibenclamide (n = 8). Aucune différence statistiquement significative n' a été mise en évidence.

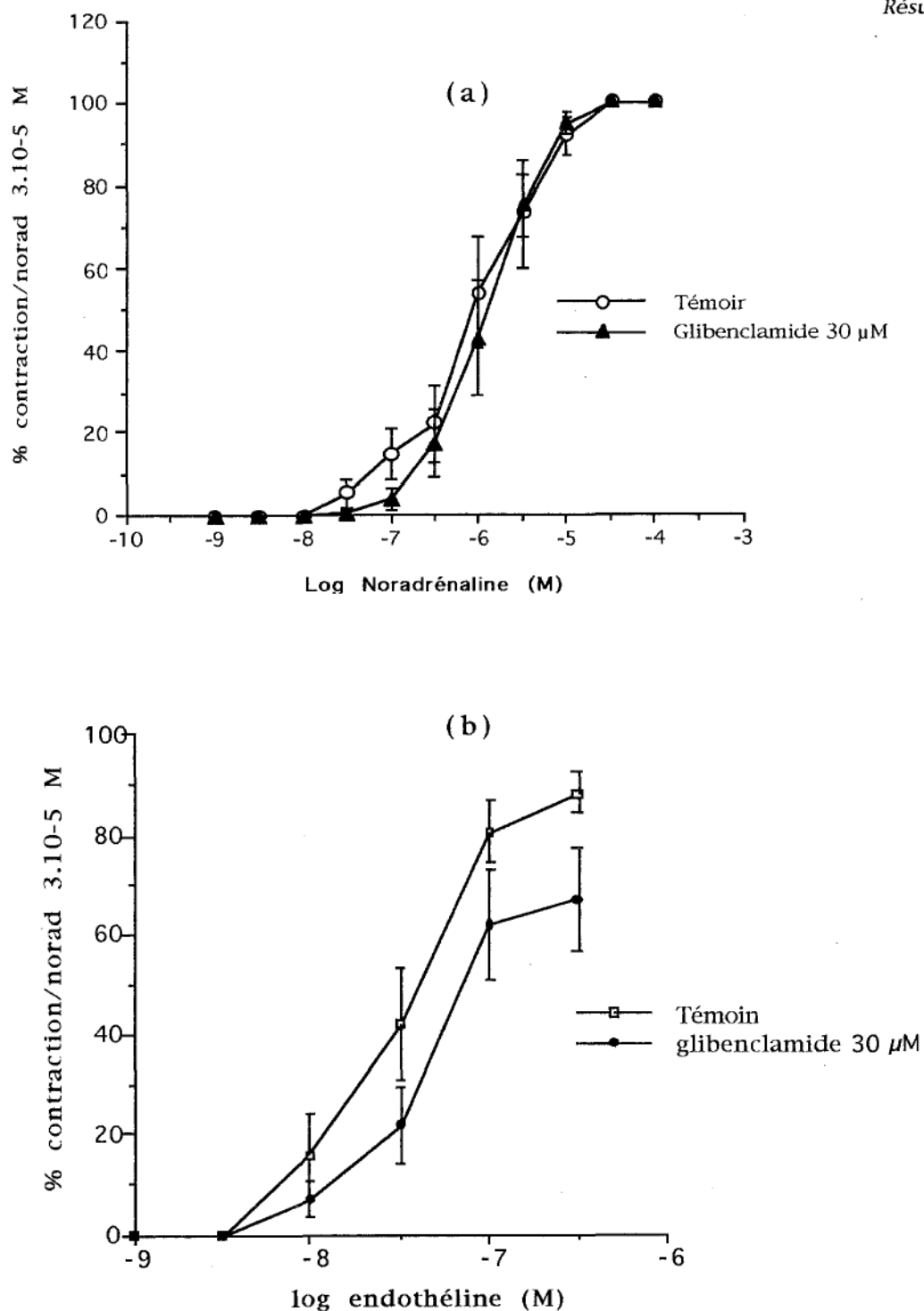


Figure 18 : courbes cumulatives concentration/contraction des AMI à la noradrénaline (a) et à l'endothéline (b) en l'absence ou en présence de $30 \mu\text{M}$ de glibenclamide ($n = 6$ à 8).

	VS		AMI	
Agoniste	Témoin	agoniste + glibenclamide 30 μ M	Témoin	agoniste +glibenclamide 30 μ M
TXA ₂ pD ₂	8,5 $\pm$ 0,4	6,4 $\pm$ 0,4*	8,1 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 0,3*
Emax	88,7 $\pm$ 1,9	87,1 $\pm$ 2,3	92,0 $\pm$ 0,9	97,3 $\pm$ 4,7
5-HT pD ₂	6,6 $\pm$ 0,3	6,9 $\pm$ 0,3	nd	nd
Emax	100\$	100,0\$ (par définition)	nd	nd
Norad pD ₂	nd	nd	6 $\pm$ 0,2	5,8 $\pm$ 0,2
Emax	nd	nd	100,0£	100,0£ (par définition)
endothéline				
pD ₂	nd	nd	7,5 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,1
Emax	nd	nd	88,0 $\pm$ 4,2	68,1 $\pm$ 10,4

Tableau 4 : Comparaison des pD₂ et Emax du TXA₂, de la 5-HT, de la noradrénaline et de l'endothéline, sur AMI ou VS en l'absence ou en présence de 30 μ M de glibenclamide. Chaque valeur moyenne a été calculée sur 7 à 8 anneaux vasculaires

* : $p < 0,05$, nd = non déterminé, \$: valeur de référence pour le calcul de Emax du TXA₂ sur VS, £ : valeur de référence pour le Emax du TXA₂ sur AMI.

3 - Effet du furosémide

3 - 1 Effet du furosémide sur le tonus de base des AMI et des VS

L'addition de furosémide sur les préparations musculaires lisses a provoqué une relaxation moyenne sur le tonus de base de $92,4 \pm 2,3$ % sur les AMI ($n = 10$), et de $85,4 \pm 9,2$ % sur les VS ($n = 10$) par rapport à la relaxation totale obtenue par $3 \cdot 10^{-4}$ M de papavérine. De même, l'indométhacine, à une concentration de 10^{-6} M, a induit une relaxation sur le tonus de base de $40,3 \pm 6,4$ % sur les AMI ($n = 10$) et de $35,5 \pm 2,6$ % sur VS.

3 - 2 Effet du furosémide sur la contraction à l'U-46619 des AMI et des VS

L'augmentation progressive de la dose de furosémide (10^{-4} M à 10^{-3} M) a entraîné une diminution de la sensibilité de la réponse contractile des AMI (Figure 19 a) et des VS (Figure 19 b) au TXA₂, sans modifier son efficacité. L'analyse de Schild de l'effet du furosémide sur la réponse au TXA₂ révèle un pA₂ égal à $4,4 \pm 0,2$ M (pente de régression linéaire : $1,50 \pm 0,30$; $P = 0,17$) pour les AMI (Figure 20 a), et un pA₂ de $4,2 \pm 0,1$ M (pente de régression linéaire : $1,20 \pm 0,1$; $p = 0,77$) pour les VS (Figure 20 b).

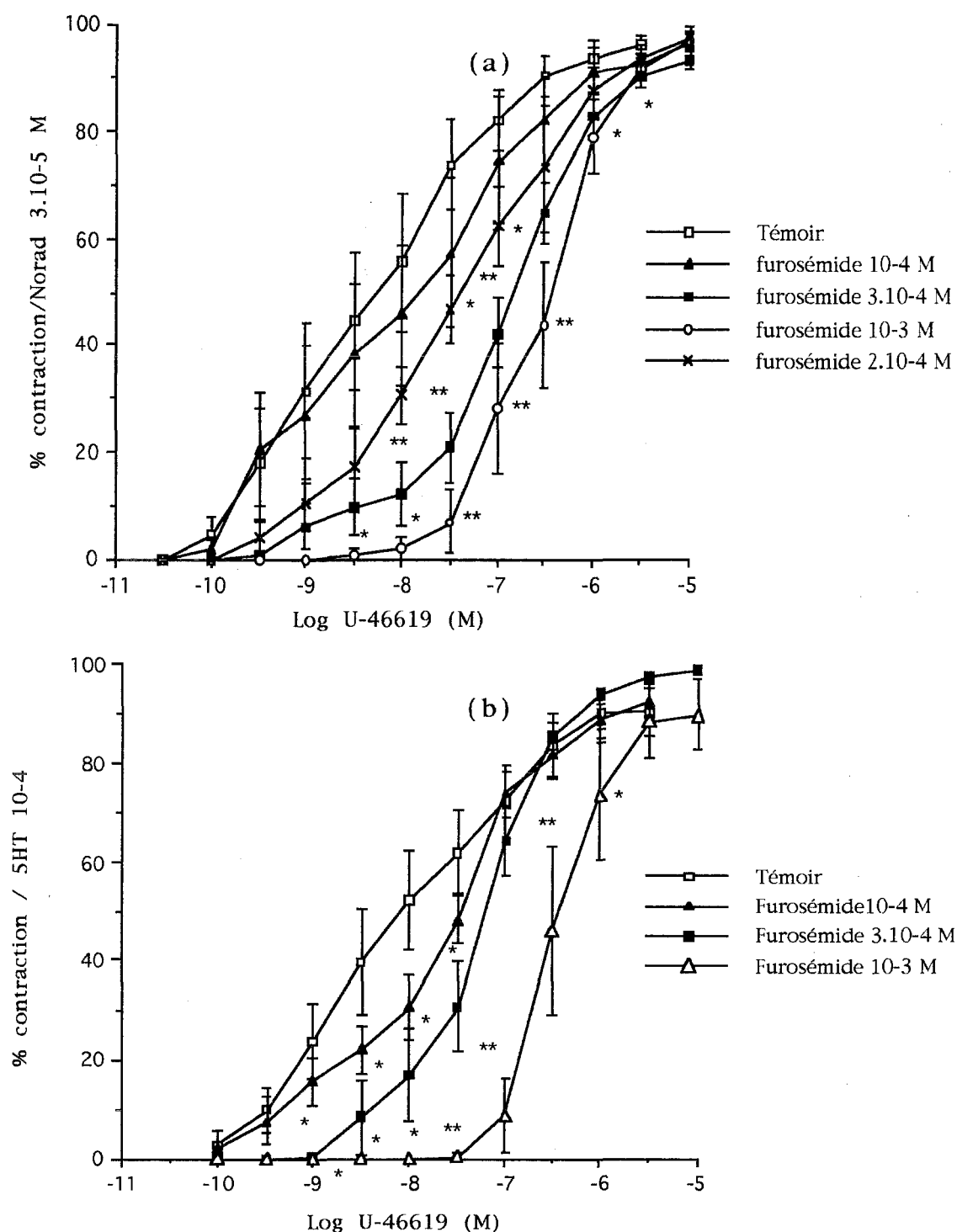


Figure 19 : courbes concentrations cumulées /contraction des AMI (a) et des VS (b) à l'U46619, en l'absence ou en présence de 10-4, 2.10-4, 3.10-4 et 10-3 M de furosémide, (n = 7 à 8 anneaux vasculaires pour chaque concentration de furosémide. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$)

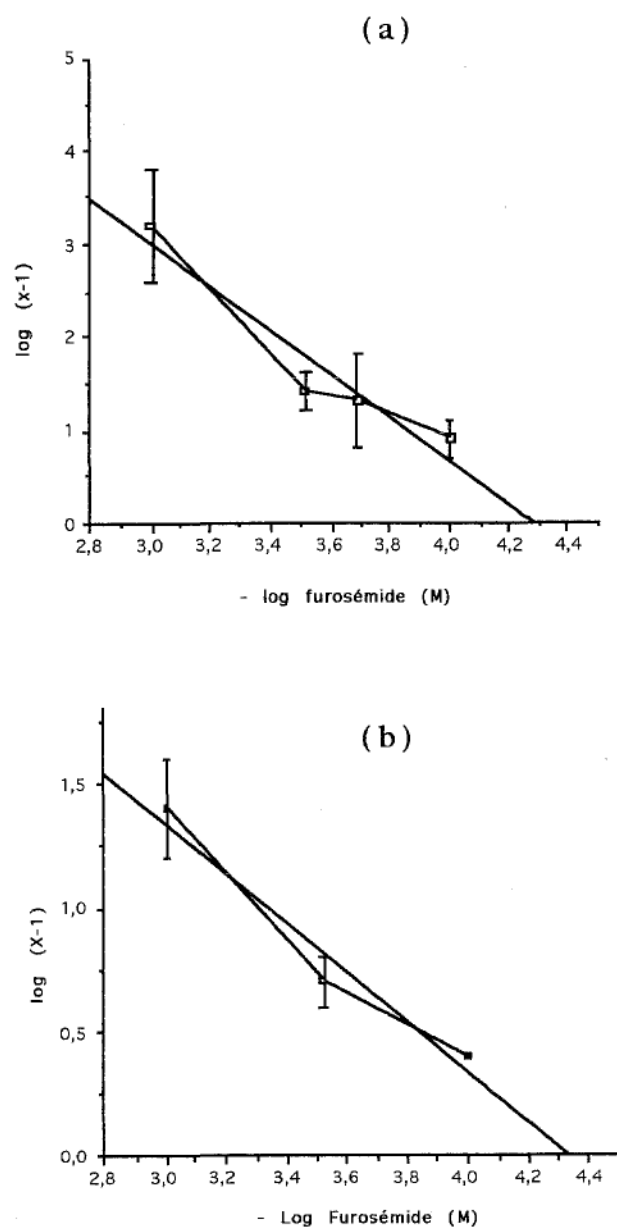


Figure 20 : Représentation graphique de l'antagonisme du furosémide sur les AMI (a) et les VS (b) selon l'analyse de Schild ($n = 7$ à 8 anneaux vasculaires pour chaque concentration d'antagoniste).

3 - 3 Effet du furosémide sur la contraction à la noradrénaline et à l'endothéline des AMI, et sur la contraction à la 5-HT des VS

Le pré-traitement des AMI et VS par 10^{-3} M de furosémide ne modifie pas la réponse contractile des VS à la 5-HT (Figure 21), ni celle des AMI à la noradrénaline (Figure 22 a) et l'endothéline (Figure 22 b) par rapport à leurs témoins respectifs (Tableau 5).

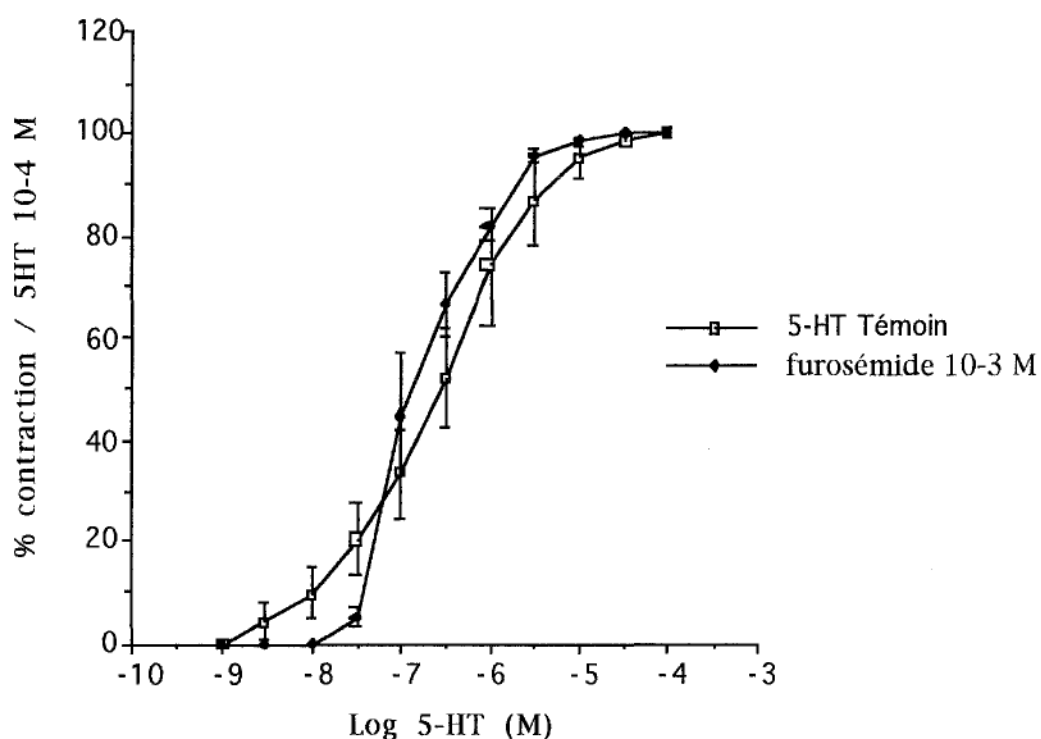


Figure 21 : Courbes concentrations cumulées/contraction des VS à la 5-HT en l'absence ou en présence de 10^{-3} M de furosémide ($n = 6$ à 7 anneaux vasculaires pour chaque courbe). Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence.

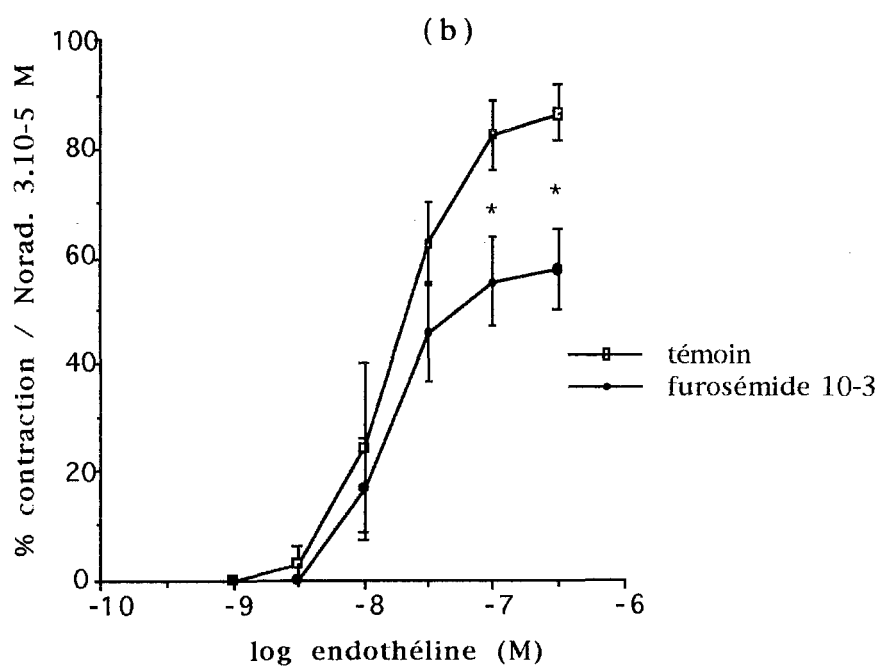
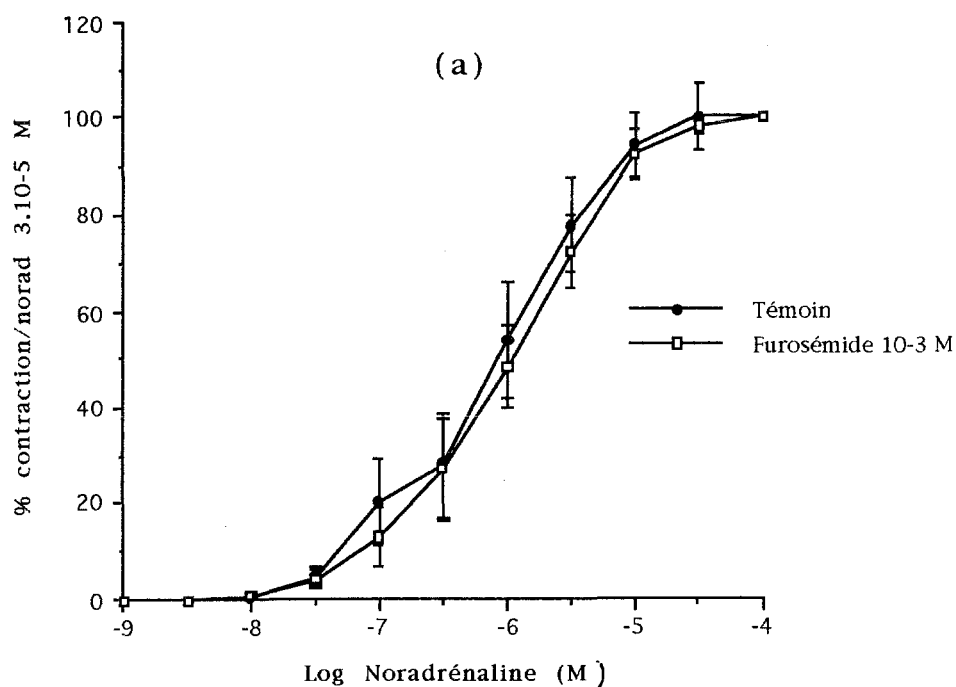


Figure 22 : Courbes concentrations cumulées-contraction des AML à la noradrénaline (a) et à l'endothéline (b) en l'absence ou en présence de 10^{-3} M de furosémide ($n = 4$ à 7 anneaux vasculaires pour chaque courbe). * : $p < 0,05$

Agoniste	VS		AMI	
	Témoin	agoniste + furosémide 10^{-3} μ M	Témoin	agoniste + furosémide 10^{-3} μ M
TXA2 pD2	$7,6 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,2^*$	$8,2 \pm 0,5$	$6,3 \pm 0,2^*$
Emax	$94,8 \pm 2,6$	$88,5 \pm 7,6$	$95,0 \pm 2,4$	$95,5 \pm 1,7$
5 HT pD2	$6,6 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,1$	nd	nd
Emax	100\$	100,0\$	nd	nd
Norad pD2	nd	nd	$6,0 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,2$
Emax	nd	nd	100,0£	100,0£
endothéline pD2	nd	nd	$7,5 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,1$
Emax	nd	nd	$88,0 \pm 4,2$	$57,6 \pm 7,6^*$

Tableau 5 : Comparaison des pD2 et Emax du TXA2, de la 5-HT, de la noradrénaline et de l'endothéline, sur AMI ou VS en l'absence ou en présence de 10^{-3} M de furosémide. Chaque valeur moyenne a été calculée sur 7 à 8 anneaux vasculaires.

* : $p < 0,05$, nd = non déterminé, \$: valeur de référence pour le calcul de Emax du TXA2 sur VS, £ : valeur de référence pour le Emax du TXA2 sur AMI.

3 - 4 Effet de l'indométhacine sur l'inhibition de la contraction à l'U-46619 induite par le furosémide

L'addition de 10^{-6} M d'indométhacine est sans influence sur l'effet inhibiteur exercé par le furosémide vis-à-vis de la contraction des AMI (Tableau 6, Figure 23 a ,) et des VS (Tableau 6, Figure 23 b) induite par le TXA₂.

	pD2 des AMI		pD2 des VS	
	indo (-)	indo (+)	indo (-)	indo (+)
TXA ₂	8,4 ± 0,3	7,9 ± 0,3	8,0 ± 0,3	8,5 ± 0,2
TXA ₂ + furo 10 ⁻⁴ M	8,2 ± 0,5	7,7 ± 0,3	7,6 ± 0,1	8,1 ± 0,2
TXA ₂ + furo 3.10 ⁻⁴ M	7,2 ± 0,3	7,2 ± 0,1	7,2 ± 0,1	8,0 ± 0,4
TXA ₂ + furo 10 ⁻³ M	6,3 ± 0,2	6,2 ± 0,1	6,3 ± 0,2	6,6 ± 0,2

Tableau 6 : comparaison de l'inhibition de la contraction au TXA₂ des AMI et VS en l'absence (indo -) ou en présence de 10^{-6} M (indo +) d'indométhacine ajoutée 15 minutes avant l'incubation avec les différentes concentrations de furosémide (furo). Aucune différence significative n'a été trouvée.

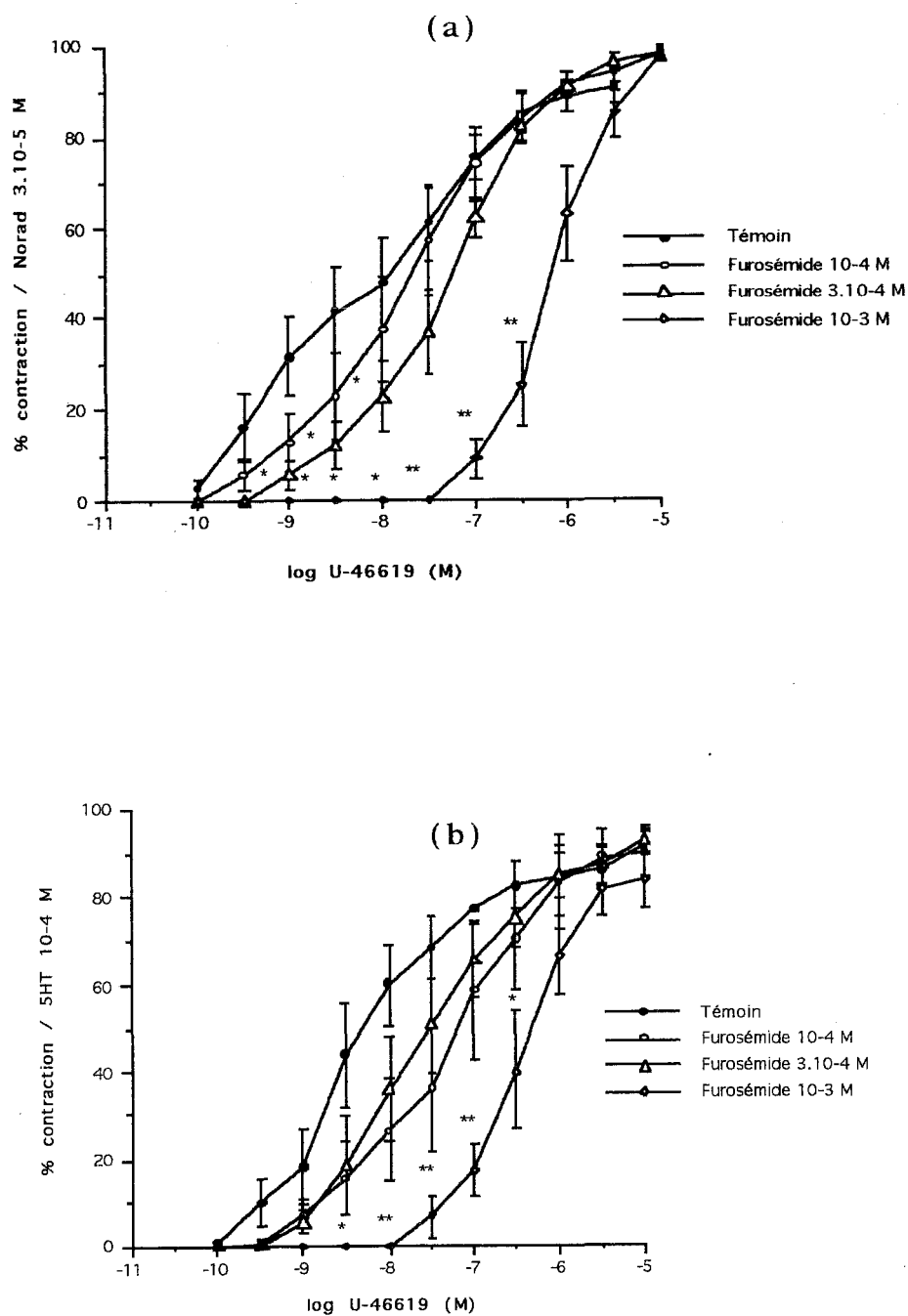


Figure 23 : Rôle de l'indométhacine 10⁻⁶ M sur l'inhibition de contraction à l'U-46619 provoquée par le furosémide sur AMI (a) et VS (b). (n = 7 à 8 anneaux vasculaires pour chaque courbe), * : p < 0,05, ** : p < 0,01

4 - Effet d'un antagoniste sélectif, le GR32191, sur la contraction à l'U-46619 des AMI et des VS

Le GR32191 à 3.10^{-9} M, 3.10^{-8} M et 3.10^{-7} M a entraîné un déplacement vers la droite et de façon totalement parallèle des courbes concentration-contraction à l'U-46619 tant sur AMI (Figure 24 a) que sur VS (Figure 24 b).

L'analyse de Schild de l'antagonisme du GR32191 a révélé un pA_2 de $8,80 \pm 0,30$ (pente de la régression linéaire = $1,10 \pm 0,10$, non statistiquement différent de 1, $p = 0,90$) sur les AMI (Figure 25 a) et de $8,90 \pm 0,70$ (pente de la régression linéaire = $1,60 \pm 0,40$, non statistiquement différent de 1, $p = 0,22$) sur les VS (Figure 25 b).

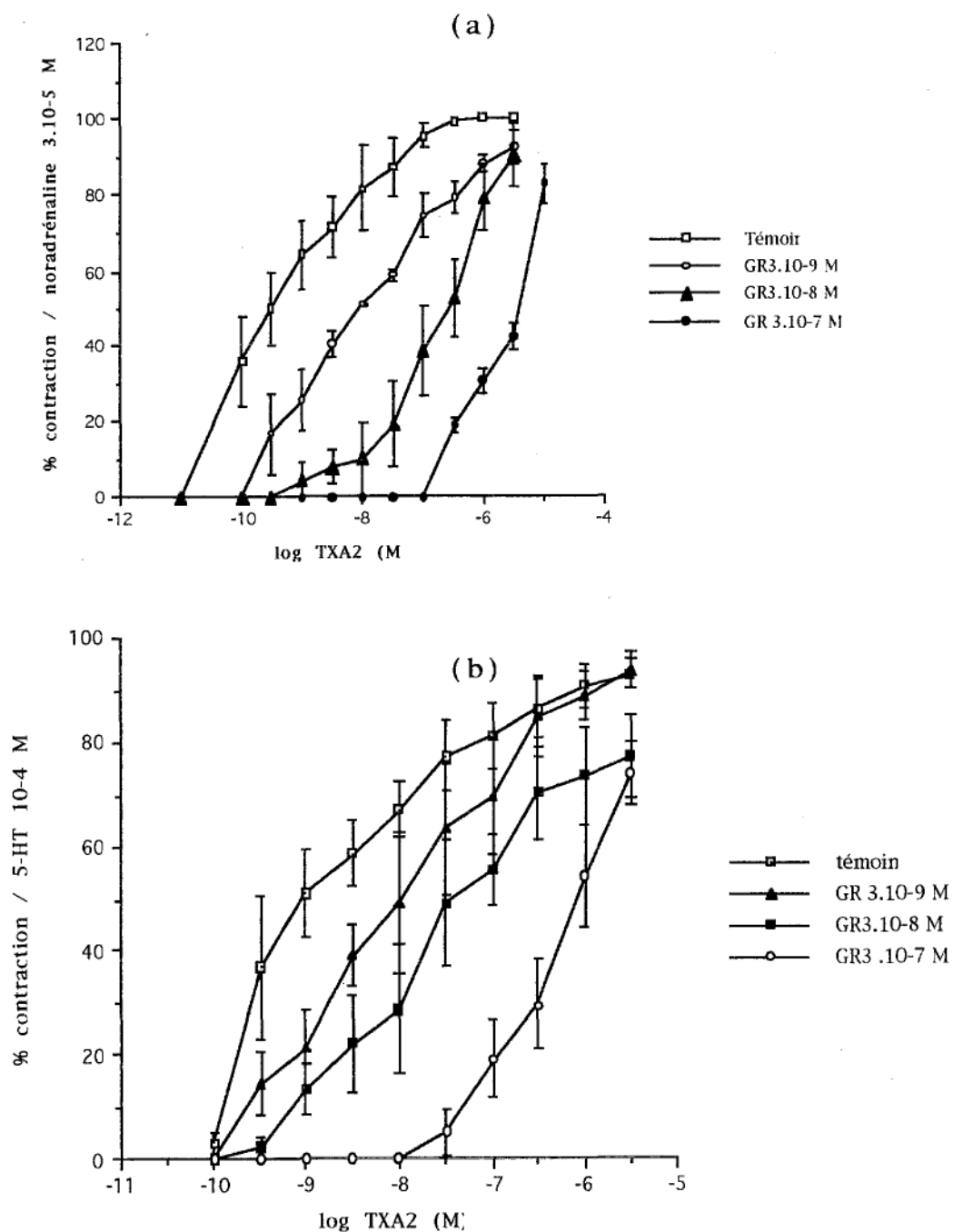
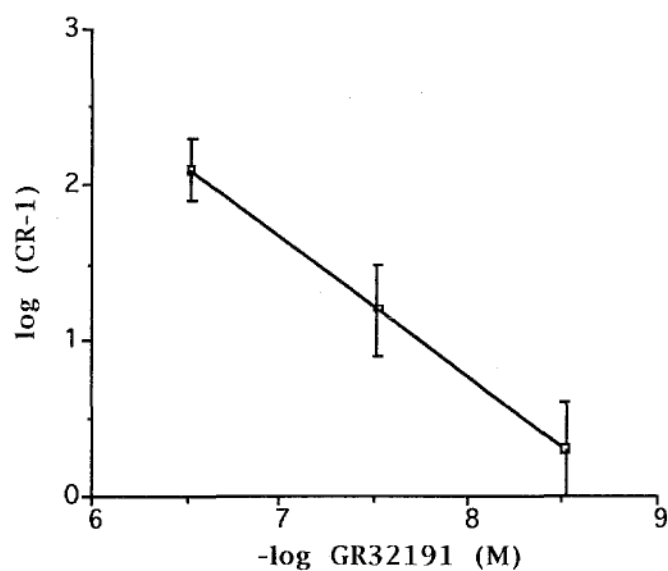


Figure 24 : Courbes concentrations cumulées-contraction des AMI à l'U-46619 en l'absence ou en présence GR32191 à 3.10^{-9} M, 3.10^{-8} M, 3.10^{-7} M ($n = 4$ anneaux vasculaires pour chaque courbe).

(a)



(b)

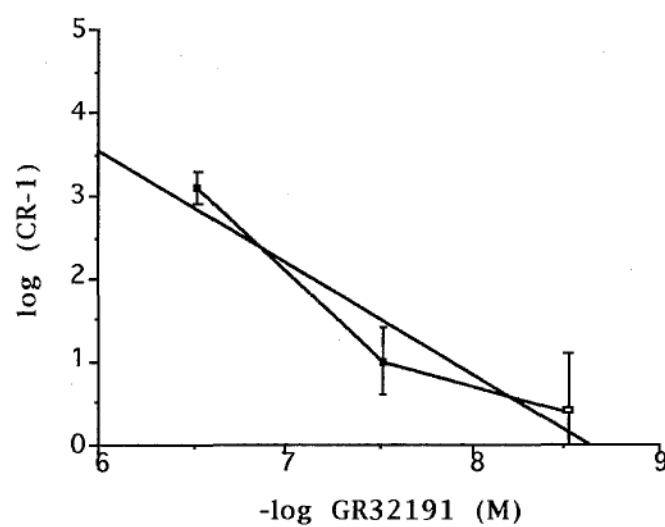


Figure 25 : Représentation graphique de l'analyse de Schild de l'effet du GR32191 sur la contraction à l'U-46619, sur AMI (a) et sur VS (b), $n = 4$ pour chaque concentration d'antagoniste.

DISCUSSION

1 - Analyse des courbes diamètre-tension

Les valeurs de diamètre et de force de repos des AMI utilisées dans notre étude sont voisines de celles retrouvées par Dignan (Dignan et col., 1992) mais différentes de celles retrouvées par d'autres auteurs (He et col., 1989). Ces discordances sont dues aux différents niveaux de prélèvement de ces artères (niveau de section plus ou moins distal) et démontrent bien l'intérêt de la procédure de normalisation pour que les différents résultats expérimentaux soient comparables aussi bien sur le même type d'artère que sur des préparations obtenues à partir de territoires artériels différents.

2 - Effet du glibenclamide

2 - 1 Effet du glibenclamide sur le tonus de base des AMI et des VS

L'addition de glibenclamide à 30 μ M dans la cuve à organe isolé a entraîné une diminution du tonus de base des AMI et des VS. Cet effet pourrait sembler inattendu puisque le glibenclamide, en bloquant les canaux potassiques ATP dépendants, devrait induire une vasoconstriction (Nelson et Quayle, 1995).

Cette diminution du tonus de base observée sur les anneaux vasculaires peut être expliquée par le déplacement du TXA₂ endogène par le glibenclamide et, bien que les canaux potassiques ATP dépendants jouent un rôle important dans la régulation du tonus myogénique (Nelson et Quayle, 1995), il apparaît dans notre étude, que le TXA₂ est également un médiateur majeur.

Cette hypothèse semble confirmée par le fait que l'administration d'indométhacine à 10^{-6} M a induit une diminution du tonus de base. Ainsi, après un pré-traitement des AMI par de l'indométhacine, le glibenclamide ne devrait plus provoquer de diminution du tonus de base des vaisseaux. Cependant, d'autres investigations seront nécessaires pour vérifier cette proposition.

2 - 2 Effet du glibenclamide sur la contraction à l'U-46619 des AMI et des VS.

Le déplacement vers la droite et de façon parallèle des courbes dose/réponse au TXA₂ en présence de 3, 10 ou 30 μ M de glibenclamide d'une part, et l'obtention par l'analyse de Schild d'une pente non différente de l'unité d'autre part, orientent vers le caractère compétitif de l'antagonisme du glibenclamide sur le récepteur TP d'AMI et de VS humaines. Cet effet observé est bien imputable au glibenclamide puisque le pré-traitement des AMI ou des VS par du méthanol au 1/100ème ne provoque pas de déplacement des courbes. Le glibenclamide semble présenter une action relativement spécifique sur le récepteur TP du muscle lisse vasculaire humain car l'incubation avec 30 μ M de glibenclamide ne modifie pas de façon significative la réponse contractile des AMI à la noradrénaline et à l'endothéline, ni celle des VS à la sérotonine.

En 1990, Cocks a suggéré que le glibenclamide se comportait comme un antagoniste du récepteur TP sur artère coronaire canine. Nos résultats abondent en ce sens et mettent en évidence une nouvelle propriété du glibenclamide sur les AMI et VS humaines. De plus, cet effet est observé pour des concentrations voisines des concentrations plasmatiques obtenues lors d'un traitement per os (Pearson, 1990). De nombreuses études cliniques ou in vitro ont déjà suggéré l'interaction du glibenclamide, et des sulfonylurées hypoglycémiantes en

général, avec les prostanoides.

Le glibenclamide semble interagir avec le TXA₂ à différents niveaux. D'une part, il diminue la synthèse de TXA₂ (Brunner et col., 1984, Florskowski et col., 1988). D'autre part, le glibenclamide semble se comporter comme un antagoniste compétitif du TXA₂ sur muscle lisse vasculaire humain.

Par ailleurs, le glipizide, autre sulfonurée hypoglycémiant, provoque, chez les diabétiques, une restauration de la synthèse de PGI₂ (Florskowski et col., 1988) par un mécanisme indirect : il diminue la peroxydation des phospholipides membranaires ; or la formation de peroxydes lipidiques stimule les cyclo-oxygénases en favorisant la synthèse de TXA₂ et en inhibant celle de PGI₂. Donc, en atténuant la formation de peroxydes lipidiques, le glipizide pourrait également inhiber la formation de TXA₂. Sur aorte de rat et de cobaye, Fujitani et col. (1983) ont montré que le glicazide augmentait la transformation d'acide arachidonique et de PGH₂ en PGI₂, et que la prémédication par de l'aspirine, un inhibiteur irréversible de la cyclo-oxygénase, ou par de l'hydrocortisone, un inhibiteur de la phospholipase A₂, inhibait la formation de PGI₂. Ces résultats suggèrent que l'un des impacts pharmacologiques du glipizide pourrait être l'étape de conversion du PGH₂ en PGI₂. De façon surprenante, cette même étude montre que le glibenclamide entraîne *in vitro* une diminution de la synthèse de PGI₂. Transposée *in vivo*, cette dernière donnée irait à l'encontre de toutes les études cliniques indiquant une diminution de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire à l'endothélium vasculaire observées après administration de glibenclamide (Klaff et col., 1979, Brunner et col., 1984, De Bellis et col., 1984), d'autant plus que les sujets atteints de diabète juvénile présentent un taux anormalement bas de PGI₂ (Silverbauer et col., 1979). Cependant, ce résultat contradictoire est à considérer avec précaution du fait des possibilités de différences inter-espèces.

Néanmoins, l'interaction du glibenclamide avec le TXA₂ explique la diminution de l'agrégation plaquettaire observée dans de nombreuses études cliniques : Brunner et col. (1984) ont montré que le traitement de diabétiques pendant 8 semaines par du glibenclamide diminuait le taux sérique de TXB₂ et le taux de bêta-thromboglobuline, qui est un marqueur de l'agrégation plaquettaire. Cette interaction du glibenclamide avec les prostanoides peut être particulièrement intéressante dans le traitement du diabète car cette maladie est caractérisée, entre autre, par une hyperagrégation plaquettaire (Fujitani et col., 1983) qui contribuerait à la pathogénèse de la microangiopathie diabétique. Des études réalisées sur des rats diabétiques ont mis en évidence une synthèse accrue de TXA₂ par les plaquettes en réponse à certains agonistes tels que l'ADP et le collagène. De plus, il semblerait que les plaquettes de sujets diabétiques présentent davantage d'acide arachidonique dans leurs phospholipides de membrane par rapport à des sujets sains (Morita et col., 1983). L'administration de glibenclamide pendant 6 à 12 mois entraîne une diminution de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP et l'adrénaline (Ponari et col., 1979).

La maladie diabétique est également caractérisée par une série de perturbations biochimiques et s'accompagne d'une production accrue de radicaux libres (anions superoxydes, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyl) qui serait parallèle au déséquilibre glycémique. De plus, il existerait une diminution des anti-oxydants endogènes piègeurs de radicaux libres tels que superoxyde-dismutase, vitamine E et surtout glutathion réduit. Ces radicaux libres provoquent une oxydation en chaîne des lipides membranaires (Grimaldi et col., 1993). Par ailleurs, Morrow et col. (1990) ont mis en évidence chez des modèles de rats ayant subi un stress oxydatif secondaire à l'administration de CCl₄, la formation d'une série de molécules apparentées aux prostaglandines,

dont la formation est indépendante de la cyclo-oxygénase. En effet, les phospholipides des membranes cellulaires, cibles des radicaux libres formés lors d'un stress oxydatif, sont transformés, par réaction radicalaire, en molécules apparentées aux prostaglandines des séries E et F qui se fixent également sur le récepteur TP et semblent se comporter comme des agonistes (Armstrong et col., 1995). Il ne paraît pas invraisemblable que des composés appartenant à cette famille de prostaglandines soient également synthétisés chez des patients diabétiques. Dans ce cas, le glibenclamide pourrait offrir une double protection vasculaire, d'une part vis-à-vis du thromboxane synthétisé en excès, et d'autre part vis-à-vis de la synthèse de prostaglandines apparentées aux prostaglandines E et F.

L'athérosclérose et les troubles lipidiques sont les causes majeures de la morbidité et de la mortalité des sujets diabétiques, et ces patients présentent souvent des hyperlipidémies et des troubles lipidiques (Waysbort et col., 1988). En effet, l'athérosclérose généralisée, fréquemment observée dans le diabète, entraîne une prédisposition particulière des sujets diabétiques à l'infarctus du myocarde (Klaff et col., 1981). Par ses propriétés antagonistes du récepteur TP, le glibenclamide pourrait participer à la prévention du développement de l'athérosclérose, puisqu'il a été démontré que des antagonistes du récepteur TP pouvaient inhiber le dépôt de cholestérol sur la paroi vasculaire (Osborne et col., 1988). En effet, lors de l'initiation de la maladie athéromateuse, plusieurs études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré que, dans un environnement enrichi en cholestérol, les plaquettes présentaient une sensibilité accrue à différents agents pro-agrégants dont le TXA₂ (Carvalho et col., 1974). L'antagonisme du glibenclamide vis-à-vis du récepteur TP pourrait ainsi atténuer l'hyperagrégation plaquettaire caractéristique des sujets diabétiques. D'autre part, lors de la propagation de la maladie athéromateuse, les plaquettes

activées relarguent des facteurs chimiotactiques et mitogéniques (Plaquet Derived Growth Factor) qui, lorsqu'ils sont libérés par les plaquettes activées, induisent la croissance et la prolifération du tissu musculaire lisse et promeuvent la formation de la plaque d'athérome. Ainsi, de par ses propriétés antagonistes du récepteur TP, le glibenclamide pourrait limiter partiellement les risques de thrombose.

Le diabète est une pathologie associant anomalie vasculaire et hyperagrégation plaquettaire (Mustard et col., 1984). Les propriétés protectrices et anti-agrégantes plaquettaires que nous venons de décrire pourraient contribuer au bénéfice clinique du traitement du diabète par les sulfonylurées: d'une part, ces molécules stimulent la synthèse d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans ; d'autre part, elles pourraient prévenir le spasme artériel et veineux, l'agrégation plaquettaire et, par conséquent, le développement de la micro-angiopathie diabétique.

Cependant, seules des études cliniques bien menées permettront d'évaluer à long terme le bénéfice réel du glibenclamide sur la prévention des complications vasculaires de la maladie diabétique.

3 - Effet du furosémide

3 - 1 Effet du furosémide et de l'indométhacine sur le tonus de base des AMI et des VS

L'addition d'indométhacine à une concentration connue pour bloquer l'activité des cyclo-oxygénases (10^{-6} M) et de furosémide à 10^{-3} M a entraîné une diminution du tonus de base des AMI et des VS. Ces résultats confirment ceux obtenus avec le glibenclamide. En effet, en bloquant les cyclo-oxygénases par

de l'indométhacine, la synthèse de PGI₂ et de TXA₂ est abolie, ce qui confirme le rôle important des prostanoïdes dans la régulation du tonus basal. De plus, la forte vasodilatation observée après l'addition de furosémide peut s'expliquer par le déplacement du TXA₂ endogène, mais également par le blocage des cotransporteurs Na⁺/K⁺/2Cl⁻ vasculaires (Kreye et col., 1981). Cette dernière hypothèse est confirmée par le fait qu'une diminution du tonus de base est observée par l'addition de furosémide sur des anneaux artériels pré-traités par de l'indométhacine.

3 - 2 Effet du furosémide sur la contraction à l'U-46619 des AMI et des VS

L'analyse de nos données expérimentales montre que le furosémide se comporte comme un antagoniste compétitif vis-à-vis du récepteur TP des AMI et des VS humaines, et que le pré-traitement par l'indométhacine, un puissant inhibiteur de la cyclo-oxygénase, n'altère pas cet effet.

De nombreuses études montrent que les mécanismes par lesquels le furosémide induit ses effets hémodynamiques ne sont pas encore élucidés, et un certain nombre d'hypothèses sont avancées telles que : un effet diurétique puissant induisant une réduction de volume sanguin (Goodman et Gilman, 1985), un effet vasodilatateur dépendant des prostaglandines (Katayama et col., 1984, Kirchner, 1987) ou un effet direct du furosémide sur le muscle lisse vasculaire (Deth et col., 1987, Greenberg et col., 1994).

Notre étude réalisée *in vitro* confirme cette dernière hypothèse : le furosémide exerce un effet direct en bloquant le récepteur au TXA₂ et la présence d'indométhacine ne modifie pas l'effet inhibiteur du furosémide sur

la vasoconstriction induite par le TXA₂, suggérant ainsi qu'il ne résulte pas de l'induction d'une synthèse de PGI₂ endothéliale. Ces résultats vont dans le sens des travaux réalisés par Greenberg et col., (1994) qui ont montré que l'ibuprofène, un autre inhibiteur de la cyclo-oxygénase, n'inhibait pas l'effet vasodilatateur du furosémide. De même, sur bronche humaine isolée, Molimard et col. (1995) ont démontré que l'antagonisme du furosémide vis-à-vis du récepteur TP n'était pas modifié par la présence d'indométhacine.

Nos travaux révèlent que l'antagonisme du furosémide au niveau du récepteur TP semble être spécifique, puisque le furosémide à forte concentration n'inhibe pas chez l'homme la réponse contractile à la noradrénaline ni à la sérotonine, et n'entraîne pas de modification du PD₂ des courbes doses-effets à l'endothéline. Ces résultats pourraient contribuer à expliquer l'effet vasodilatateur précoce du furosémide dans l'oedème aigu du poumon (Biagi et col., 1967). En effet, une étude réalisée sur poumon d'agneau isolé perfusé a mis en évidence qu'un analogue stable du TXA₂ induisait une augmentation de la pression de l'artère et de la veine pulmonaires, secondaire à une vasoconstriction (Yoshimura et col., 1988). Par ailleurs, cette étude montre que l'analogue du TXA₂ induit la formation d'un oedème pulmonaire important, conséquence de la vasoconstriction et de l'extravasation des protéines plasmatiques, et que l'augmentation de la pression pulmonaire et la formation de l'oedème sont inhibées par l'addition d'un antagoniste du récepteur TP, ce qui confirme l'implication du TXA₂ dans la vasoconstriction et la formation de l'oedème. Ainsi, l'effet précoce du furosémide dans le traitement de l'oedème aigu du poumon pourrait en partie être expliqué par ses propriétés antagonistes vis-à-vis du récepteur TP vasculaire humain.

De plus, Greenberg et col., (1994) ont démontré que la relaxation de veines pulmonaires canines induite par le furosémide n'était pas modifiée par

le prétraitement des anneaux veineux par du glibenclamide ou du tétra-éthyl-ammonium, un bloqueur non spécifique des canaux potassiques, ce qui implique que le furosémide n'agit pas via les canaux potassiques. Ces mêmes auteurs démontrent également que le bleu de méthylène, un inhibiteur de la guanylate cyclase, et le L-Nitro-méthyl Arginine (L-NMA), un inhibiteur de la NO synthase, ne modifient pas la relaxation induite par le furosémide sur des artères et veines pulmonaires canines contractées à l'U-46619. Ces résultats abondent dans le sens d'un effet anti-vasoconstricteur exercé par le furosémide indépendant de la synthèse de prostaglandines vasodilatatrices.

Cependant, contrairement à Greenberg et col. (1994) qui mettaient en évidence un effet sélectif du furosémide sur le muscle lisse vasculaire veineux, et expliquaient ces résultats par une inégale répartition des co-transporteurs $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ au niveau des artères et des veines, nos résultats indiquent la même intensité d'effet du furosémide au niveau du muscle lisse vasculaire artériel et veineux. Toutefois, notre étude et l'analyse de la littérature ne permettent pas d'affirmer que les récepteurs TP sont répartis de façon équivalente tant sur artères mammaires internes que sur veines saphènes humaines.

De plus, une souche de rats génétiquement hypertendus présente une production accrue de TXA_2 , responsable de la vasoconstriction et de la prolifération de tissu musculaire lisse (Ishimitsu et col., 1988). L'antagonisme du furosémide vis-à-vis du récepteur TP pourrait participer au bénéfice thérapeutique du furosémide dans le traitement de l'hypertension artérielle.

Après administration orale de 40 mg de furosémide ou de 20 mg par voie intraveineuse, le pic de concentration plasmatique (C_{max}) de furosémide est de $1,5 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ et $5,4 \pm 2,2$ respectivement, ce qui équivaut à une concentration d'environ 10^{-5} M/l . Or, l'effet antagoniste du furosémide à l'égard du récepteur

TP, démontré dans notre étude, ne s'observe que pour des concentrations supérieures d'un facteur 50 par rapport aux concentrations habituellement obtenues en routine. Cependant, le furosémide étant très fortement lié aux protéines plasmatiques, il est possible que son interaction avec le récepteur TP ait un retentissement clinique dans les situations de fortes concentrations plasmatiques ou dans des cas d'hypoalbuminémie.

Le furosémide semble donc exercer un effet direct sur le muscle lisse vasculaire humain, et nos résultats abondent en ce sens.

4 - Analyse de la diminution de la réponse contractile endothéline-dépendante des AMI en présence de furosémide ou de glibenclamide

Le prétraitement des AMI avec du furosémide a induit une diminution de la réponse maximale (Emax) de contraction à l'endothéline, sans modification du pD₂.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat : d'une part, la contraction du muscle lisse vasculaire à l'endothéline est modulée par de nombreux médiateurs tels que le NO (Frozard et col., 1992) et les prostaglandines vasodilatatrices (Rogerson et col., 1993). Le furosémide, en stimulant le relargage d'acide arachidonique (Weber et col., 1977) ou en exerçant un effet vasodilatateur similaire à celui de la PGI₂ (Lundergan et col., 1988) pourrait ainsi atténuer la réponse contractile des AMI à l'endothéline. Cependant, bien qu'elle ne soit pas statistiquement différente, une baisse de l'Emax de la réponse contractile des AMI à l'endothéline est également observée

en présence de glibenclamide. Or, le glibenclamide, chez le rat, n'induit pas, *in vivo*, d'augmentation de la synthèse de PGI₂ (Fujitani et col., 1983). Ainsi, d'autres investigations seront nécessaires pour élucider ce point, soit en pré-traitant les AMI par de l'indométhacine, pour voir si l'atténuation de l'effet de l'endothéline par le furosémide est bien dû au relargage de prostaglandines vasodilatatrices, soit en utilisant un antagoniste du récepteur TP très spécifique et sélectif, tel que le GR32191 pour vérifier si le blocage des récepteurs TP entraîne une diminution de l'Emx de l'endothéline.

5 - Comparaison de l'antagonisme du glibenclamide et du furosémide vis-à-vis du TXA₂, à celui du GR32191, un antagoniste du récepteur TP de référence

Le déplacement vers la droite des courbes concentrations-contractions de l'U-46619 en présence de furosémide ou de glibenclamide ne sont parallèles que dans la partie basse des courbes, c'est-à-dire pour des concentrations d'U-46619 comprises entre 10^{-10} et 10^{-6} M. De plus, bien qu'elles ne soient pas statistiquement différentes de l'unité, les pentes de la régression linéaire de l'analyse de Schild sont anormalement élevées. Or, l'U-46619 ne présente une sélectivité pour le récepteur TP que pour les concentrations comprises entre 2.10^{-9} et 2.10^{-7} M (Armstrong et col., 1995). Il est donc possible qu'au-delà de ces concentrations, l'U-46619 se fixe sur d'autres récepteurs tels que les récepteurs FP ou DP sur lesquels le glibenclamide ou le furosémide sont sans action. Ainsi, pour étudier si le déplacement non parallèle dans la partie haute des courbes était dû à un effet non spécifique de l'U-46619, ou à un antagonisme de type non compétitif du glibenclamide et du furosémide, nous avons étudié la contraction des AMI et des VS à l'U-46619 en présence d'un antagoniste

compétitif très sélectif et puissant du récepteur TP, le GR32191, dont les effets sur les muscles lisses vasculaires sont connus.

Le GR32191 a entraîné un déplacement vers la droite totalement parallèle et de façon dose - dépendante des courbes concentration-contraction à l'U-46619 tant sur AMI que sur VS.

Les pA_2 obtenus dans notre étude sont similaires à ceux obtenus sur AMI (He et col., 1995) et sur artères pulmonaires humaines (Humphrey et col., 1989, Lumley et col., 1989), ce qui assure la reproductibilité et la validité de nos résultats.

Du fait du parallélisme des courbes concentration-contraction à l'U-46619 en présence de GR32191, l'hypothèse de la non sélectivité pour le récepteur TP de l'U-46619 à forte concentration doit être écartée.

Ainsi, l'aspect atypique des courbes et les valeurs anormalement élevées de la pente de la régression linéaire de l'analyse de Schild - bien qu'elles ne soient pas statistiquement différentes de l'unité -, ne permettent pas de conclure que l'antagonisme du glibenclamide et du furosémide vis-à-vis du récepteur TP est de type compétitif.

Néanmoins, le glibenclamide et le furosémide semblent être des antagonistes très sélectifs du récepteur TP.

6 - Comparaison des pA_2 du glibenclamide et du furosémide obtenus sur VS et AMI

De nombreuses études pharmacologiques (Tymkewycz et col., 1991, Mais et col., 1985, Dorn et col., 1989) ont mis en évidence qu'un antagoniste sélectif du récepteur TP pouvait présenter des affinités différentes sur les récepteurs vasculaires et plaquettaires. Le pA_2 étant caractéristique du récepteur et de

l'antagoniste considérés, nos résultats montrant le même pA₂ du glibenclamide vis-à-vis du TXA₂ sur des préparations de muscles lisses vasculaires artériels et veineux vont dans le sens de l'existence du même sous - type de récepteur TP au niveau des muscles lisses vasculaires chez l'homme. Par ailleurs, les pA₂ du furosémide sur AMI, VS, et bronches humaines (Molimard et col., 1995) sont similaires, suggérant que le même type de récepteur pourrait être présent sur les vaisseaux et sur les bronches comme l'ont proposé des études immunohistochimiques (Nüsing et col., 1993, Borg et col., 1993), et la biologie moléculaire (Hirata et col., 1991, Pierce et col., 1995).

7 - Etude relation structure - activité

Le glibenclamide et le furosémide ont un groupement fonctionnel commun : le groupement sulfonylurée. Ce groupement fonctionnel est retrouvé dans des antagonistes spécifiques du récepteur TP tels que le BL 13.177 ou Solubatran, et BM13505 ou Dalbatran (Fiddler et col., 1990) . Cependant, d'autres molécules connues pour leurs propriétés antagonistes vis-à-vis du récepteur TP sont dépourvues de groupement sulfonylurée (Faull et col., 1995), et le tolbutamide, autre sulfonylurée de deuxième génération, diminue de façon non significative la sensibilité du TXA₂ sur artères coronaires de chien (Cocks et col., 1990). D'autres investigations sont nécessaires pour établir si les propriétés anti-spastiques vis-à-vis du TXA₂ du glibenclamide et du furosémide sont des propriétés intrinsèques, particulières à ces deux molécules, ou si ces propriétés sont partagées par d'autres molécules de structure différente mais appartenant à la même classe pharmacologique.

Conclusions

CONCLUSIONS

Le glibenclamide et le furosémide sont deux médicaments couramment utilisés : le premier étant indiqué dans le traitement du diabète non-insulino dépendant, le second dans le traitement de l'oedème aigu du poumon et de l'hypertension artérielle essentielle.

Le thromboxane A₂, médiateur endogène puissant de l'agrégation plaquettaire, de la vasoconstriction, et de l'extravasation des protéines plasmatiques, est impliqué dans le développement de nombreuses situations pathologiques cardiaques ou vasculaires.

L'étude que nous avons réalisée in vitro, sur artères mammaires internes et veines saphènes humaines, a mis en évidence une propriété inattendue du glibenclamide et du furosémide. En effet, ces deux molécules inhibent la réponse contractile du muscle lisse vasculaire humain induite par le thromboxane A₂.

La sélectivité d'action du glibenclamide et du furosémide vis-à-vis de la contraction des vaisseaux au thromboxane A₂, comparativement aux contractions induites par la sérotonine, la noradrénaline et l'endothéline, confirme que le glibenclamide et le furosémide semblent se comporter comme deux antagonistes du récepteur au thromboxane A₂.

Cette nouvelle propriété du glibenclamide et du furosémide renforce l'intérêt de leur utilisation dans certaines situations cliniques ; le glibenclamide pourrait ainsi jouer un rôle préventif sur le développement de la microangiopathie diabétique, et le furosémide exercer des effets vasodilatateurs et anti-oedémateux précoces dans le traitement des maladies cardiovasculaires.

CONCLUSIONS

Mémoire soutenu par Françoise STANKE LABESQUE

Le glibenclamide et le furosémide sont deux médicaments couramment utilisés : le premier étant indiqué dans le traitement du diabète non-insulino dépendant, le second dans le traitement de l'oedème aigu du poumon et de l'hypertension artérielle essentielle.

Le thromboxane A₂, médiateur endogène puissant de l'agrégation plaquettaire, de la vasoconstriction, et de l'extravasation des protéines plasmatiques, est impliqué dans le développement de nombreuses situations pathologiques cardiaques ou vasculaires.

L'étude que nous avons réalisée in vitro, sur artères mammaires internes et veines saphènes humaines, a mis en évidence une propriété inattendue du glibenclamide et du furosémide. En effet, ces deux molécules inhibent la réponse contractile du muscle lisse vasculaire humain induite par le thromboxane A₂.

La sélectivité d'action du glibenclamide et du furosémide vis-à-vis de la contraction des vaisseaux au thromboxane A₂, comparativement aux contractions induites par la sérotonine, la noradrénaline et l'endothéline, confirme que le glibenclamide et le furosémide semblent se comporter comme deux antagonistes du récepteur au thromboxane A₂.

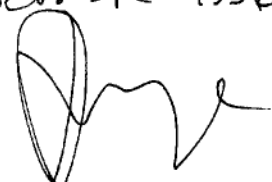
Cette nouvelle propriété du glibenclamide et du furosémide renforce l'intérêt de leur utilisation dans certaines situations cliniques ; le glibenclamide pourrait ainsi jouer un rôle préventif sur le développement de la microangiopathie diabétique, et le furosémide exercer des effets vasodilatateurs et anti-oedémateux précoces dans le traitement de maladies cardiovasculaires.

Vu, le Directeur de l'UFR
de Pharmacie
Grenoble, le

Le président du Jury

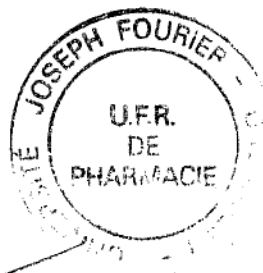
P. DETENGE

Le 14 octobre 1996



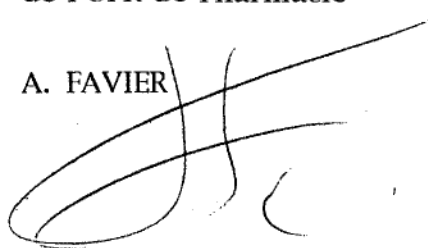
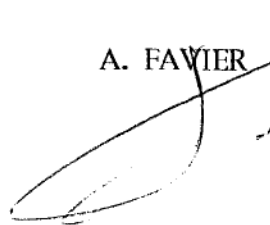
VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le
Vu, pour le président de l'Université
Joseph FOURIER-Grenoble 1, le Directeur
de l'UFR de Pharmacie



A. FAVIER

A. FAVIER



Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ambler J., Birch J., Maguire E. D., Wallis R.B.

Role of thromboxane A₂.

Adv Exp Med Biol 1985 ; 192 : 293 - 308.

Anderson S. D., Temple D. M.

Effect of furosemide on antigen-induced release of histamine and sulfidopeptide leukotrienes from sensitized human lung fragments.

N Eng J Med 1991 ; 324 (2) : 191.

Andreasen F., Chistensen J. H.

The effect of furosemide on vascular smooth muscle is influenced by plasma protein.

Pharmacol Toxicol 1988 ; 63 : 324 - 326.

Armstrong R. A., Wilson N. H.

Aspect of the thromboxane receptor system.

Gen Pharmacol 1995 ; 26 (3) : 463 - 472.

Arunlakshana O., Schild H. O.

Some quantitative uses of drug antagonists.

Br J Pharmacol Chemother 1959 ; 14 : 48.

Benet L. Z.

Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of furosemide in man : a review.

J Pharmacokinet Biopharm 1979 ; 7 (1) : 1 - 27.

Bertrand C., Landry Y.

Approche fonctionnelle de l'étude des ligands et des récepteurs. Dans Pharmacologie moléculaire. Ed Yves Landry. Edition Medsi, Paris, 1989 : 265-294.

Biagi R. W., Bapat B. N.

Furosemide in acute pulmonary oedema.

Lancet 1967, 849.

Borg C., Lam S. C., Dieter J. P., Lim C. T., Komiotis D., Venton D. L., Le Breton G. C.

Anti-peptide antibodies against the human blood platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor.

Biochem Pharmacol 1993 ; 45 : 2071-2078.

Bourland W. A., Day D. K., Williamson H. E.

The role of the kidney in the early natriuretic action of furosemide to reduce elevated left atrial pressure in the hypervolemic dog.

J Pharmacol Exp Ther 1977 ; 202 : 221-229.

Boyd A. E.

The role of ion channels in insulin secretion.

J Cell Biochem 1992 ; 48 : 234 - 241.

Brittain R. T., Boutal D. SC., Carter M. C., Coleman R. A., Collington E. W., Gelsow H. P. et col.

AH23848 : a novel thromboxane receptor-blocking drug that can clarify the physiopathologic role of thromboxane A₂.

Circulation 1985 ; 72 (6) : 1208 - 1218.

Brunner D., Klinger J., Weisbort J., Tuval M., Nakash J., Rosenber C. H., Nissim S.
Thromboxane, prostacyclin, beta-thromboglobulin, and diabetes mellitus.

Clin Ther 1984 ; 6 : 636 - 642.

Buckingham R. E., Hamilton T. C., Howlett D. R., Mootoo S., Wilson C.

Inhibition by glibenclamide of the vasorelaxant action of cromakalim in the rat.

Br J Pharmacol 1989 ; 97 : 57 - 64.

Cannon P. J.

Eicosanoids and the blood vessel wall.

Circulation 1984 ; 70 (4) : 523 - 528.

Chardigny C., Jebera V., Descombes J. J., Acar C., Verbeuren T., Fabiani J. N.

Propriétés vasoréactives des artères radiales et mammaires internes ; application à la chirurgie coronaire.

Arch Mal Coeur 1994 : 87 : 1185-93 .

Cocks T. M., King S. J., Angus J. A.

Glibenclamide is a competitive antagonist of the thromboxane A₂ receptor in dog coronary artery in vitro.

Br J Pharmacol 1990 ; 100 : 375 - 378.

Coffman T. M., Carr D., Yarger W. E., Klotman P. E.

Evidence that renal prostaglandin and thromboxane production is stimulated in chronic cyclosporine nephrotoxicity.

Transplantation 1987 ; 43 (2) : 282 - 285.

Coker S. J., Parrat J. R.,

Antiarhythmic activity of the thromboxane antagonist AH23848 during canine myocardial ischaemia and reperfusion.

Br J Pharmacol 1984 ; 83 : 380 P.

Coleman R. A., Humphrey P. P. A., Kennedy L., Levy G. P., Lumley P.

Comparison of the action of U-46619, a prostaglandin H₂-analogue, with those of prostaglandin H₂ and thromboxane A₂ on some isolated smooth muscle preparations.

Br J pharmacol 1981 ; 73 : 773-778.

Coleman R. A., Humphrey P. P. A., Kennedy I., Lumley P.

Prostanoid receptor : the development of a working classification

Trends Pharmacol Sci 1984 ; 5 : 303-306.

Coleman R. A., Smith W. L., Narumiya S.

Classification of prostanoid receptors : properties, distribution, and structure of the receptor and their subtypes.

Pharmacol Rev 1994 ; 46 : 205 - 229.

- Davies G. C., Sobel M., Saltzman E. W.
Elevated plasma fibrinopeptide A and thromboxane B2 levels during cardiopulmonary bypass.
Circulation 1980 ; 61 (4) : 808-813.
- De Bellis R., Novoa E., Dol B., Cazerez J.
Changes in platelet aggregation caused by glyburide in diabetic patients.
Clin Ther 1984 ; 6 (3) : 335 - 341.
- Deth R. C., Payne R. D., Peecher D. M.
Influence of furosemide on rubidium-86 uptake and alpha adrenergic responsiveness of arterial smooth muscle.
Blood vessels 1987 ; 24 : 321-333.
- Devillier P., Bessard G.
Thromboxane A2 and related prostaglandins in airways.
Fund Clin Pharmacol 1996 (sous presse).
- Dignan R. J., Yeh T., Dyke C.M., Lee K.F., Lutz H.A., Ding M., Wechler A.S.
Reactivity of gastroepiploic and internal mammary arteries.
J Thorac Cardiovasc Surg 1992 ; 103 : 116-123.
- Dorn G. W.
Distinct platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptor subtypes.
J Clin Invest 1989 ; 84 : 1883 - 1891.

Dorn G. W., Becher M. W.

Thromboxane A₂ stimulates signal transduction in vascular smooth muscle.

J Pharmacol Exp Ther 1992 ; 256 (1) : 447 - 456.

Dubé G. P., Mais D. E., Jakubowski J. A., Brune K. A., Utterback B. G. et col.

In vitro characterization of a novel TXA₂/PGH₂ receptor ligand (S-145) in platelets and vascular and airway smooth muscle.

J Pharmacol Exp Ther 1992 ; 262 (2) : 784 - 791.

Eltze M.

Glibenclamide is a competitive antagonist of cromakalim, pinacidil and RP 49356 in guinea-pig pulmonary artery

Eur J Pharmacol 1989 ; 165 : 231 - 239.

Elwood W., Lotvall J. O., Barnes P. J., Chung K. F.

Loop diuretics inhibit cholinergic and noncholinergic nerves in guinea pig airways.

Am rev Respir Dis 1991 ; 143 : 1340 - 1344.

Faull W., Bewster A. G., Brown G. R., Smithers M. J., Jackson R.

Dual acting thromboxane receptor antagonist/synthase inhibitor : synthesis and biological properties of athenoic acid.

J Med Chem 1995, 38 : 686 - 694.

Fiddler G. I., Lumley P.

Preliminary clinical studies with TXA2 synthase inhibitors and TXA2 receptors blockers.

Circulation 1990, 81 (Supp I), I69 - 78.

Fitzgerald D.J., Roy L., Catella F., Fitzgerald G. A.

Platelet activation in unstable coronary disease.

N Eng J Med 1986a ; 315 : 983 - 989.

Fitzgerald D.J., Doran J., Jackson E., Fitzgerald G. A.

Coronary vascular occlusion mediated via thromboxane A2-prostaglandine endoperoxyde receptor activation in vivo.

J Clin Invest 1986b ; 77 : 496 - 503.

Florkowski C. M., Richardson M. R., Le Guen C., Jennings P.E., O'Donnel M. J., Jones A. F., Barnett A. H.

Effect of glicazide on thromboxane B2 parameter of haemostasis, fluorescent IgG and lipid peroxides in non-insulin dependant diabetes mellitus.

Diabetes Res 1988 ; 9 (2) : 87 - 90.

Foegh M. L., Winchester J. F., Zmudka M. et col.

Urine i-TXB2 in renal allograft rejection.

Lancet 1981 ; II : 431 - 434.

Foegh M. L., Maddox Y. T., Ramwell P. W.

Human peritoneal eosinophils and formation of arachidonate cyclooxygenase products.

Scand J Immunol 1982 ; 23 : 599 - 603.

Frozard J. F., Part M. L.

The role of nitric oxide in the regional vasodilator effects of endothelin -1 in the rat.

Br J Pharmacol 1992 ; 105 : 744 - 750.

Fujitani B., Maeda J., Tsuboi T., Kadokawa T., Shimizu M.

Effect of glicazide on prostaglandin I₂ formation in normal and streptozotocin-induced diabetic animals.

Jpn J Pharmacol 1983 ; 33 : 965 - 970.

Gerkens J. F.

Does furosemide have vasodilator activity ?

Trends Pharmacol Sci 1987, 8 : 254-257.

Goodman L. et Gilman A.

High-ceiling diuretics. Ed Goodman et Gilman, chapitre 36. Editions MacMillan, Inc. Dallas, 1993 : 896 - 899.

Greenberg S., McGowan C., Xie J., Summer W.

Selective pulmonary and venous smooth muscle relaxation by furosemide : a comparison with morphine.

J Pharmacol Exp Ther 1994, 270 : 1077 - 1085.

Greenwood I.A., Hogg R.C., Large W. A.

Effect of furosemide, ethacrynic acid and indanyloxyacetic acid on spontaneous Ca activated currents in rabbit portal vein smooth muscle cells.

Br J Pharmacol 1995, 115 : 733 - 738.

Gresele P., Deckmyn H., Huybrechts E., Pieters G., Vermyn J.

Role of proaggregatory and antiaggregatory prostaglandins in hemostasis.

J Clin Invest 1987 ; 80 : 1435 - 1445.

Gresele P., Deckmyn H., Nenci G. G., Vermyn J.

Thromboxane synthase inhibitors, thromboxane receptor antagonists and dual blockers in thrombotic disorders.

Trends Pharmacol Sci 1991 ; 12 : 158 - 163.

Grimaldi A., Dumont N.

La microangiopathie diabétique. Dans les diabètes, comprendre pour traiter. Ed Grimaldi A., Sachon C., Bosquet F. Editions médicales internationales. Paris, 1993 : 256 - 257.

Hall S.T.

Thromboxane A₂ receptor antagonists.

Med Res Rev 1991 ; 11 : 503 - 579.

He G. W., Angus J. A., Rosenfeldt F. L.

Reactivity of the canine isolated internal mammary artery, saphenous veins and coronary artery to constrictor and dilator substances : relevance to coronary bypass graft surgery.

J Cardiovasc Pharmacol 1988 ; 12 : 12 - 22.

He G. W., Buxton B., Rosenfeldt F. L., Wilson A. C., Angus A.

Weak β -adrenoceptor-mediated relaxation in the human internal mammary artery.

J Thorac Cardiovasc Surg 1989a ; 97 : 259 - 266.

He G. W. , Rosenfeldt F. L., Buxton B. , Wilson A. C., Angus A.

Reactivity of human isolated internal mammary artery to constrictor and dilator agents.

Circulation 1989b ; 80 (Suppl I) : I-141 - I-150.

He G.W., Yang C. Q.

Effect of thromboxane A₂ antagonist GR3191 on prostanoid and non prostanoid receptors in the human internal mammary arteries.

J Cardiovasc Pharmacol 1995 ; 26 (1) : 13-19.

Hendra T., Collins P., Penny W., Sheridan D.

Dazoxiben in stable angina,

Lancet 1983 ; 1041.

Hinchcliff K. W., McKeever K. H., Muir W. W., Sams R. A.

Pharmacologic interaction of furosemide and phenylbutazone in horses.

Am J Vet Res 1995 ; 56 : 1207 - 1212.

Hirata M., Hayashi Y., Ushikubi F., Yokota Y., Kageyama F., Nakanishi S., Narumiya S.

Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A₂ receptor.

Nature 1991 ; 349 : 617 -620.

Humphrey P. P. A. , Hallet P., Hornby E. J., Wallis C. J., Colington E. W., Lumley P.

Pathophysiological actions of thromboxane A₂ and their pharmacological antagonisms by thromboxane receptor blockade with GR32191.

Circulation 1990 ; 81 (suppl I) : I-42 - I-52.

Ikram H., Chan E., Espiner A., Nicholls M. G.

Haemodynamic and hormone response to acute and chronic furosemide therapy in congestive heart failure.

Clin Sci 1980; 59: 443 - 449.

Ishimitsu T., Uehara Y., Ishii M., Ikeda T., Matsuoka H., Sugimoto T.

Thromboxane and vascular smooth muscle cell growth in genetically hypertensive rats.

Hypertension 1988; 12: 46 -51.

Johston G. D., Hiatt W. R., Nies A. S., Payne N. A., Murphy R. C., Gerber J.

Factors modifying the early nondiuretic vascular effect of furosemide in man.

Circ Res 1983; 53: 630-635.

Juergens U. R., Christiansen S. C., Stevenson D. D., Zuraw B. L.

Acid arachidonic metabolism in monocytes of aspirin-sensitive asthmatic patients before and after oral aspirin challenge.

J Allergy Clin Immunol 1992; 90: 636 - 645.

Katayama S., Attallah A. A., Stahl R. A., Bloch D. L., Lee J. B.

Mechanism of furosemide-induced natriuresis by direct stimulation of renal prostaglandin E2.

Am J Physiol 1984; 247: F555-F561.

Kirchner K. A.

Indomethacine antagonizes furosemide's intratubular effects during loop segment microperfusion.

J Pharmacol Exp Ther 1987, 243 : 881 - 886.

Klaff L. J., Vinik A. J., Jackson W. P., Malan E., Kernoff L., Jacobs P.

Effect of sulfonylurea drugs glicazide and glibenclamide on blood glucose control and platelet function.

S Afr med J 1979 ; 56 : 246 - 250.

Klaff L. J., Kernoff L., Vinik A. J., Jackson W. P., Jacobs P.

Sulfonulureas and platelet function.

Am J Med 1981 ; 70 : 627 - 630.

Knezevic I., Borg C., Le Breton G. C.

Identification of Gq as one of the G-proteins which co-purify with human platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors.

J Biol Chem 1993 ; 268 (34) : 26011-26017.

Kondo K., Seo R., Omawari N., Imawaka H., Wakitani K., Kira H., Kawasaki A.

Effect of ONO-3708, an antagonist of the tromboxane A₂/prostaglandin endoperoxyde receptor, on blood vessels.

Eur J Pharmacol 1989 ; 168 : 193 - 200.

Krauss A. H., Woodward D. F., Gibson L. L., Potzman C. E., Williams L. S. et col.
Evidence for human thromboxane receptor heterogeneity using a novel series
of 9, 11-cyclic carbonate derivatives of prostaglandin F 2alpha.

Br J Pharmacol 1996 ; 117 : 1171 -1180.

Kreye V. A., Bauer P. K., Villhauer I.

Evidence for furosemide-sensitive active chloride transport in vascular smooth
muscle.

Eur J Pharmacol 1981 ; 73 : 91 - 95.

Lewis H. D., Davies J. W., Archibald D. G., Steinke W. E., Smitherman T. C., Doherty
J. E. et col.

Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in
men with unstable angina.

N Eng J Med 1983 ; 309 (7) : 396 -403.

Lorentz R. L., Weber M., Kotzur J., Theisen K., Schacky C. V., Meister W.,
Reichardt B., Weber P. C.

Improved aortocoronary bypass patency by low dose aspirin (100 mg daily).
Effect on platelet aggregation and thromboxane formation.

Lancet 1984 ; 1261 - 1263.

Lumley P., White B. P., Humphrey P. P. A.

GR32191, a highly potent and specific thromboxane A2 receptor blocking drug
on platelets, vascular and airways smooth muscle in vitro.

Br J Pharmacol 1989 ; 97 : 783 - 794.

Lundergan C. F., Fitzpatrick T. M., Rose J. C., Ranwell P. W., Kot P. A.

Effect of cyclooxygenase inhibition on the pulmonary vasodilator response to furosemide.

J Pharmacol Exp Ther 1988 ; 246 : 102 - 106.

Marche P.

Pharmacologie cardio-vasculaire et respiratoire. Dans Seconds messagers et effecteurs internes. Ed Advenier C, Meyer P, edition Hermann. Paris 1992 ; 3-20.

Maseri A.

Clinical development of thromboxane A₂ antagonists.

Circulation 1990 ; 81 (1) : I-79 - I-82.

Mais D. E., Dunlap C., Hamanaka N., Halushka P. V.

Further studies on the effects of epimers of thromboxane A₂ antagonists on platelets and veins.

Eur J Pharmacol 1985 ; 111 : 125-128.

Mais D. E., Saussy D. L., Chaikhouni J. R. A., Kochel P. J., Knapp D. R., Hamanaka N., Halushka P. V.

Pharmacologic characterization of human and canine thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor in platelets and blood vessels : evidence for different receptors.

J Pharmacol Exp Ther 1985 ; 233 : 418 - 424.

Miyanoshita A., Terada M., Endou H.

Furosemide directly stimulates prostaglandine E2 production in the thick ascending limb of henle's loop.

J Pharmacol Exp Ther 1989 ; 251 : 1155-1159.

Molimard M., Naline E., Hirsch A., Advenier C.

Furosemide inhibits bradykinin-induced contraction of human isolated small bronchi : evidence for TP-receptor antagonism receptor.

Eur J Pharmacol 1995 ; 278 : 253 - 256.

Moreau R., Komeichi H., Kirstetter P., Yang S., Aupetit Faisant B., Cailmail S., Lebrech D.

Effect of glibenclamide on systemic and splanchnic haemodynamics in conscious rats.

Br J Pharmacol 1994 ; 112 : 649 - 653.

Morinelli T. A., Zhang L. M., Newman W. H., Meier K. E.

Thromboxane A2/prostaglandin H2-stimulated mitogenesis of coronary artery smooth muscle cells involves activation of mitogen-activated proteine kinase and S6 kinase.

J Biol Chem 1994 ; 269 (8) : 5693 - 5698.

Morita I., Takahashini R., Ito H., Orimo H., Murota S.

Increased acid arachidonic acid content in platelet phospholipids from diabetic patients.

Prostaglandins Leukotrienes Med 1983 ; 11 : 33 - 41.

Morrow J. D., Hill K. E., Burk R., Nammour T. M., Badr K. F., Roberts L. J.

A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in human by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism.

Proc Natl Acad Sci USA 1990 ; 87 : 9383 - 9387.

Mulvany M, Halpern W.

Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats.

Circ Res 1977 ; 41: 19-26.

Mustard J. F. Packham M. A.

Platelets and diabetes mellitus

N Eng J Med 1984 ; 311 (10) : 665 - 666.

Namba T., Sugimoto Y., Negishi M., Irie A., Ushikubi F., Narumiya S.

Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP₃ determines G-protein specificity.

Nature 1993 ; 365 : 166-170.

Nelson M. T., Quayle J. M.

Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle.

Am J Physiol 1995 ; 268 : C799 - C822.

Norman P., Cuthbert N. J., McKenniff M. G., Gardiner P. J.

The thromboxane receptors of rat and guinea-pig.

Eur J Pharmacol 1992 ; 229 : 171 - 178.

- Nüsing R. M., Hirata M., Kakizuta A., Eki T., Ozawa K., Narumiya S.
Characterization and chromosomal mapping of the human thromboxane A2
receptor gene.
J Biol Chem 1993 ; 268 : 25253-25259.
- Oates J. A., Fitzgerald G. A., Branch R. A., Jackson E. K., Roberts L. J.
Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A2 formation.
N Eng J Med 1988a ; 319 (11) : 689 - 698.
- Oates J. A., Fitzgerald G. A., Branch R. A., Jackson E. K., Roberts L. J.
Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A2 formation.
N Eng J Med 1988b ; 319 (2) : 761 - 767.
- Offermanns S., Laugwitz K. L., Spicher K., Schultz G.
G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin
receptor in human platelets.
Proc Natl Acad Sci USA 1994 ; 91 : 504 - 508.
- Ogletree M. L., Allen G. T.
Interspecies differences in thromboxane receptors : studies with thromboxane
receptor antagonists in rats and guinea pig smooth muscle.
J Pharmacol Exp Ther 1991 ; 260 (2) : 789 - 794.
- Osborne J. A., Lefer A. M.
Cardioprotective actions of thromboxane receptor antagonism in ischemic
atherosclerotic rabbits.
Am J Physiol 1988 ; 255 : H318 - H324.

Patak R. V., Mookerjee B. K., Bentzel C. J., Hysert P. E., Lee J. B.

Antagonism of the effect of furosemide by indomethacin in normal and hypertensive man.

Prostaglandins 1975 ; 10 (4) : 649 - 659.

Pavord I. D., Wisniewski A., Tattersfield A. E.

Inhaled frusemide and exercise induced asthma : evidence of a role for inhibitory prostanoids.

Thorax 1992 ; 47 : 797 - 800.

Pearson J. P.

Pharmacokinetics of glyburide

Am J Med 1985 ; 79 (suppl 3B) : 67 - 71.

Pierce K. L., Gil D. W., Woodward D. F., Regan J. W.

Cloning of human prostanoid receptors

Trends Pharmacol Sci 1995 ; 16 : 253-256.

Polosa R., Rajakulasingam, Prosperini G., Magris S., Mastruzzo C., Holgate S. T.

Inhaled loop diuretics and basal airway responsiveness in man : evidence of a role for cyclo-oxygenase products.

Eur Resp J Dis 1995 ; 8 : 593 - 599.

Raychowdhury M.K., Yukawa M., Collins L. J., McGrail S. H., Kent K. C., Ware A.

Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A₂ receptor.

J Biol Chem 1994 ; 269 (30) : 19256 - 19261.

Reilly A. G., Roy L., Fitzgerald G. A.

Biosynthesis of thromboxane in patients with sclerosis and Raynaud's phenomenon.

Br Med J 1986 ; 292 : 1037-1039.

Reuben S. R., Kuan P., Cairn J., Gyde O. H.

Effect of dazoxiben on exercise performance in chronic stable angina.

Br J Pharmacol 1983 ; 15 : 838 - 865.

Rogerson M. E., Cairns H. S., Fairbanks L. D., Wetwick J., Neild G. H.

Endothelin-1 in the rabbit : interaction with cyclooxygenase and NO synthase products.

Br J Pharmacol 1993 ; 108 : 843 - 843.

Saroea G. H., Inman M. D., O'Byrne P. M.

U-46619 - induced bronchoconstriction in asthmatic subjects is mediated by acetylcholine release.

Am J Respir Crit Care Med 1995 ; 151 : 321 - 324.

Schilling A., Glusa E., Muller-Schweinitzer E.

Nature of the vehicle solution for cryopreservation of human peripheral veins. Preservation of reactivity to pharmacological stimuli.

Cryobiology 1995 ; 32 : 109 - 113.

Schmid Antomachi H., Weille J. D., Fosset M., Lazdunski M.

The receptor for antidiabetic sulfonylureas control the activity of the ATP modulated K⁺ channel in insulin-secreting cells.

J Biol Chem 1987 ; 262 : 15840-15844.

Silverbauer K., Schernthaner G., Sinzinger H., Piza-Katzer H., Winter M.

Decrease vascular prostacyclin in juvenile-onset diabetes.

N Eng J Med 1979 ; 300 : 367.

Stevens E. L., Uyehara C. F., Southgate W. M.

Furosemide differentially relaxes airway and vascular smooth muscle in fetal, newborn, and adult guinea pigs.

Am Rev Respir Dis 1992 ; 146 : 1192 - 1197.

Stork J. E., Rahman M. A., Dun M. J.

Eicosanoids in experimental and human renal disease.

Am J Med 1986 ; 80 (Suppl 1 A) : 35-45.

Suzuki H., Shibata H., Murakami M., Naito M., Ichihara A., Matsumoto A.

Modulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA expression in human blood cells : comparison of platelets and mononuclear leucocytes.

Endocr J 1995 ; 42 (1) : 15-22

Teoh K. H., Fremeš S. E., Weisel R. D.

Cardiac release of prostacyclin and thromboxane A₂ during coronary revascularisation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1987 ; 93 : 120-126

Tymkewycz P. M., Jones R. L., Marr W. C.

Heterogeneity of thromboxane A₂ (TP)-receptor : evidence from antagonist but not agonist potency measurements.

Br J Pharmacol 1991 ; 102 : 607 -614.

Vargo D. L., Kramer W. G., Black P. K., Smith W. B., Serpas T., Brater C.
Bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of torsemide and
furosemide in patients with congestive heart failure.
Clin Pharmacol Ther 1995 ; 57 (6) : 601 - 609.

Waysbort J., Regitz G., Chaimowitz D., Tuval M., Nakash I., Brunner D.
Effect of glibenclamide on serum lipid, lipoproteins, thromboxane, beta-
thromboglobulin, and prostacyclin in non-insulin dependant diabetes mellitus.
Clin Ther 1988 ; 10 : 359 - 371.

Weber P. C., Scherer B., Larsson C.
Increase of free arachidonic acid by furosemide in man as the cause of
prostaglandin and renal release.
Eur J Pharmacol 1977 ; 41 : 329 - 332.

Yanni J. M., Smith W. L., Foxwell M. H.
U-46619 and carboxylic thromboxane A₂-induced increase in tracheal mucous
gel layer thickness.
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1988 ; 32 : 45 - 49.

Yoshimura K., Tod M. L., Pier K. G., Rubin L. J.
Role of venoconstriction in thromboxane-induced pulmonary hypertension
and oedema in lambs.
J Appl Physiol 1988 ; 66 : 929 - 935.



NOM Prénom	STANKE LABESQUE Françoise
TITRE DU MEMOIRE	Mise en évidence, in vitro, de l'antagonisme du glibenclamide et du furosémide vis-à-vis du récepteur au thromboxane A ₂ de muscles lisses vasculaires humains.
NATURE DU MEMOIRE	Mémoire du D. E. S. de Pharmacie Industrielle et biomédicale tenant lieu de thèse de Docteur en Pharmacie. Grenoble, 1996
RESUME	Le thromboxane A₂, métabolite majeur de l'acide arachidonique, est un médiateur majeur de l'agrégation plaquettaire et de la vasoconstriction. Parce qu'il est impliqué dans de nombreuses situations pathologiques, notamment cardiaques et vasculaires, le thromboxane A₂ est une cible thérapeutique intéressante. Par ailleurs, le glibenclamide, une sulfonylurée hypoglycémiante, et le furosémide, un puissant diurétique, exercent des effets au niveau vasculaire et interagissent avec les prostanoides. Notre étude met en évidence, in vitro, sur préparations d'artères mammaires internes (AMI) et de veines saphènes (VS) humaines que le glibenclamide et le furosémide se comportent comme deux antagonistes vis-à-vis du thromboxane A₂ : pA₂ du glibenclamide = $6,3 \pm 0,4$ M et $6,5 \pm 0,8$ M sur AMI et VS respectivement, et pA₂ du furosémide = $4,4 \pm 0,3$ M et $4,2 \pm 0,1$ M sur AMI et VS respectivement. Cet antagonisme semble être spécifique puisque le glibenclamide et le furosémide ne modifient pas la réponse contractile des AMI à la noradrénaline et à l'endothéline, ni celle des VS à la sérotonine. L'indométhacine ne modifie pas l'antagonisme du furosémide vis-à-vis de la vasoconstriction au thromboxane A₂. Cette nouvelle propriété de ces deux molécules pourrait contribuer au bénéfice clinique de leur utilisation dans la prévention de la microangiopathie diabétique pour le glibenclamide, et dans les pathologies cardiovasculaires pour le furosémide.
MOTS CLES	Tromboxane A ₂ , glibenclamide, furosémide, muscle lisse vasculaire humain
JURY <u>Président</u> <u>Membres</u>	Mr le Professeur P. DEMENGE Mr le Professeur G. BESSARD Mr le Professeur J. CALOP Mr le Professeur Ph. DEVILLIER Madame le Docteur C. MARIE Monsieur le Docteur L. FORONI
Date de soutenance	14 Novembre 1996
Adresse de l'auteur	[Données à caractère personnel]