

ACTION DE L'ÉPHÉDRINE SUR L'AORTE DU RAT *IN VITRO*: ÉTUDE À L'AIDE DE NORADRENALINE ^{14}C

GUILLAUME VALETTE, YVES COHEN et JEAN BRALET

Laboratoire de Pharmacodynamie, Faculté de Pharmacie de Paris

(Received 1 September 1965; accepted 16 September 1965)

Abstract—The aorta of the rat, previously injected intravenously with DL ^{14}C -norepinephrine, has been perfused *in vitro* with a physiological medium. The amount of ^{14}C -norepinephrine spontaneously released from aorta walls was enhanced in the presence of ephedrine. This mobilization was immediate and contemporaneous with the vessel contraction but affected only a small amount of the total ^{14}C -norepinephrine present in the aorta. This fact may support the hypothesis that the action of ephedrine is partly mediated by release of tissue catecholamines but indicates that most of the norepinephrine stores are resistant to the releasing action of ephedrine.

POUR expliquer les particularités de l'action de certaines amines sympathomimétiques, dont l'éphédrine, il a été proposé¹ pour ces substances un mécanisme d'action indirect s'effectuant par l'intermédiaire d'une libération de pyrocatécholamines tissulaires. Afin de confirmer cette hypothèse, l'action de l'éphédrine et notamment les modalités d'apparition du phénomène de tachyphylaxie ont été étudiées sur différentes préparations: utérus isolé de Cobaye,²⁻⁴ tension artérielle et patte perfusée chez le Chien,⁵ aorte isolée de Rat.⁶ Les résultats obtenus diffèrent selon la préparation utilisée. Dans le but de vérifier, d'une manière directe, une éventuelle action déplétrice de l'éphédrine vis-à-vis des pyrocatécholamines tissulaires, nous avons étudié l'influence de cette substance sur la libération de la noradrénaline à partir des parois vasculaires en utilisant une méthode originale de perfusion de l'aorte du Rat *in vitro*.

MATERIEL ET METHODES

Substances chimiques

Acétate de DL noradrénaline β - ^{14}C préparée au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay à partir de l'acide vératrique selon le procédé décrit par Pichat⁷: activité spécifique 20,5 mc/mM soit 121 $\mu\text{c}/\text{mg}$. Chlorhydrate d'éphédrine gauche (Rhône Poulenc), Alumine (Woelm) neutre, activité grade 1, lavée par décantation par l'acide chlorhydrique 0,1 N puis par l'eau distillée et séchée à 75°.

Solution physiologique de Krebs bicarbonaté selon Furchtgott et Bhadrakom.⁸

Diphényl-2,5-oxazole (DPO)

Di (phényl-2-oxazolyl)5-benzène 1-4 (POPOP)

Appareil de perfusion

La Fig. 1 décrit le montage que nous avons utilisé: une cuve remplie d'eau à 37° renferme deux réservoirs (I) et (II) de liquide de perfusion reliés, par un robinet à trois voies (R), à une canule (C₁) qui s'insère par un bouchon à la partie supérieure

d'une allonge en verre. Cette dernière est obturée à sa partie inférieure par un tube de caoutchouc fermé traversé par un cathéter de polythène (C_2) qui débouche à l'extérieur de la cuve. L'aorte (A) sera reliée à (C_1) et (C_2) par chacune de ses extrémités. L'allonge, munie dans la partie basse d'une gouttière (G) remplie d'eau, constitue ainsi une enceinte (E) qui assure autour de l'aorte une atmosphère à température et à hygrométrie constantes.

Préparation des animaux et prélevement de l'aorte

Immobilisés à la faveur d'une brève anesthésie à l'éther, des rats mâles d'un poids de 300 à 350 g reçoivent, par injection dans la veine du pénis, 20 μ c (165 μ g) de DL noradrénaline 14 C en solution dans 0,4 ml de soluté de chlorure de sodium à 9%. Deux minutes et demie après, les animaux sont sacrifiés par section des carotides. L'aorte, prélevée en deux à trois minutes, est placée dans une boîte de Pétri contenant du liquide de Krebs bicarbonaté puis débarrassée des éléments de tissu conjonctif et adipeux qui l'entourent en prenant soin de ne pas léser sa paroi. Cette opération dure une quinzaine de minutes. On délimite entre la crosse aortique et la bifurcation des artères rénales un fragment vasculaire long de 5 à 6 cm qui sera perfusé.

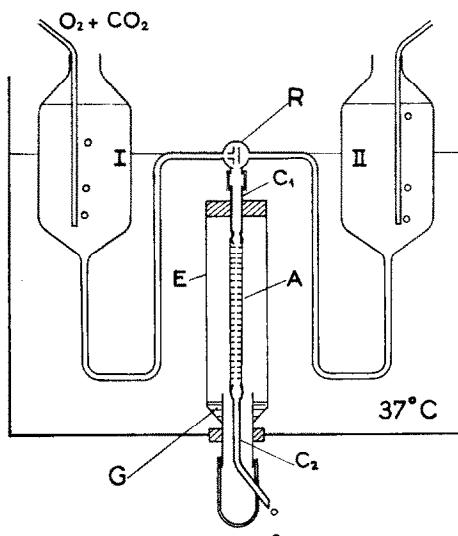


FIG. 1. Appareil de perfusion (Pour la légende des symboles se rapporter au texte).

Perfusion de l'aorte in vitro

La partie supérieure de l'aorte est liée sur la canule C_1 , l'ouverture inférieure est munie du cathéter C_2 . L'ensemble est ensuite transporté dans l'enceinte E. La perfusion de la lumière de l'aorte est établie par du liquide de Krebs bicarbonaté, aéré par du carbogène (O_2 , 95%, CO_2 , 5%) puis, suivant les expériences, poursuivie ou non avec le même liquide additionné de chlorhydrate d'éphédrine à la dose de 1 g par litre. Chacun de ces liquides est renfermé respectivement dans les réservoirs I et II. Par le jeu du robinet R, l'aorte peut être mise en relation alternativement avec l'un ou l'autre de ces derniers. Le débit, maintenu aussi constant que possible, est réglé

aux environs de 1 ml par minute. Dans ces conditions, la pression exercée par le liquide sur les parois vasculaires reste insuffisante pour entraîner des fuites par les branches latérales de l'aorte (artères intercostales) qui sont obturées. Le liquide de perfusion s'écoule en totalité par le cathéter C₂.

La durée de l'expérience est limitée à 60 min. Le perfusat, fractionné au cours du temps, est recueilli dans des flacons qui renferment 1 ml de HCl N et 0,5 ml d'une solution d'acide ascorbique (1%) et de tétracématé disodique (1%). A la fin de la perfusion l'aorte est divisée puis broyée avec du sable dans un mortier contenant 5,5 ml de HCl 0,1 N additionné de 0,5 ml de la solution d'acide ascorbique et de tétracématé mentionnée ci-dessus.

Isolement et dosage des catécholamines ^{14}C

Sur une moitié du volume de chaque échantillon on dose la radioactivité totale, tandis que sur l'autre moitié on détermine la teneur en dérivés dihydroxylés (catéchols ^{14}C).

Radioactivité totale. Après évaporation sous vide, le résidu sec est repris par 0,1 ml d'acide acétique glacial pendant cinq minutes puis par 3,2 ml d'éthanol absolu pendant dix minutes. La solution ainsi obtenue est mélangée à 11,7 ml de liquide scintillant (DPO 4 g, POPOP 0,1 g, toluène q.s. pour 1 litre) contenus dans une fiole à scintillation.

Catéchols ^{14}C . La solution acide est amenée à pH 8,4 par addition de NaOH N et Na₂CO₃ 0,5 N puis passée sur colonne d'alumine selon la technique de Whitby *et al.*⁹ Après lavage de la colonne au moyen de 5 ml d'eau distillée, l'élution est réalisée par 5 ml de HCl 0,2 N suivis de 5 ml d'eau distillée. L'éluat est évaporé à sec et repris par l'acide acétique et l'éthanol comme il est dit plus haut. Cette technique permet la séparation des catéchols c'est-à-dire des dérivés dihydroxylés aminés (noradrénaline) et désaminés (acide dihydroxy 3-4 mandélique et dihydroxy 3-4 phénylglycol). Ces derniers ne représentent normalement qu'une faible proportion des métabolites de la noradrénaline, aussi dans la suite de notre exposé désignerons-nous sous le terme noradrénaline l'ensemble des dérivés dihydroxylés. Les dosages de radioactivité sont effectués au moyen d'un compteur à scintillation liquide Tracerlab LSC 10 B.

Expression des résultats

Les moyennes sont affectées des écarts types de la moyenne:

$$M \pm S_m. \left[S_m = \sqrt{\left(\frac{\sum d^2}{n(n-1)} \right)} \right]$$

RESULTATS

1. Charge en catécholamines ^{14}C de l'aorte avant perfusion

La charge en catécholamines ^{14}C présentes dans l'aorte avant le début de l'expérience, ou radioactivité totale initiale, est calculée en additionnant la valeur de la radioactivité libérée au cours de la perfusion à celle de la radioactivité qui reste dans l'organe après la fin de l'expérience.

Le tableau 1 montre que la charge des aortes avant perfusion varie considérablement d'un vaisseau à l'autre. Les valeurs extrêmes pour l'ensemble des résultats vont de 2,27 μc pour un poids d'organe frais de 47 mg à 11,34 μc pour un poids de 65 mg. Cette charge dépend de la longueur des manipulations de préparation de l'aorte. Nous avons groupé les chiffres suivant la série d'expérience réalisée: (1) perfusion de liquide de Krebs seul, (2) perfusion d'une dose unique et prolongée

TABLEAU 1. CHARGE EN CATECHOLAMINES ^{14}C DE L'AORTE AVANT PERFUSION

	m μc	m μg	poids (mg)
Expérience I	2,27 6,06 5,81 4,83 2,38	18,74 50,06 48,04 39,90 19,71	47 68 50 65 75
$M \pm S_m$	$4,27 \pm 0,82$	$35,29 \pm 6,77$	61 ± 5
Expérience II	4,69 4,20 6,42 5,19 5,49	38,80 34,69 53,05 42,87 45,37	69 59 56 54 67
$M \pm S_m$	$5,20 \pm 0,38$	$42,96 \pm 3,14$	63 ± 2
Expérience III	7,89 5,56 4,70 5,08 11,34 9,11	65,20 45,95 38,84 41,98 93,71 75,28	66 59 70 65 65 61
$M \pm S_m$	$7,28 \pm 1,07$	$60,16 \pm 8,84$	65 ± 2

I Témoins (libération spontanée)

II Affusion unique et prolongée d'éphédrine

III Affusions répétées d'éphédrine

d'éphédrine, (3) perfusion de doses répétées d'éphédrine. Dans la première série d'expériences la moyenne des charges d'aorte est de $4,27 \pm 0,82 \mu\text{c}$ pour un poids moyen de 61 ± 5 mg; dans la seconde série, ces chiffres sont respectivement de $5,20 \pm 0,38 \mu\text{c}$ et 63 ± 2 mg tandis que dans la troisième série nous trouvons $7,28 \pm 1,07 \mu\text{c}$ et 65 ± 2 mg. On ne peut considérer comme significatives les différences observées.

2. Libération *in vitro* des catécholamines ^{14}C de l'aorte

La radioactivité libérée par minute de perfusion est rapportée à la radioactivité totale initiale et les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité initiale libérée par minute.

2.1. *Libération spontanée.* Dans une première série d'expériences, la perfusion est réalisée par du liquide de Krebs pendant une heure. La courbe d'élution de la radioactivité totale en fonction du temps, en coordonnées semi-logarithmiques (Fig. 2), montre une libération biphasique: importante pendant les six premières minutes, elle diminue et s'effectue alors selon une fonction exponentielle simple ($t_{\frac{1}{2}} : 16$ min

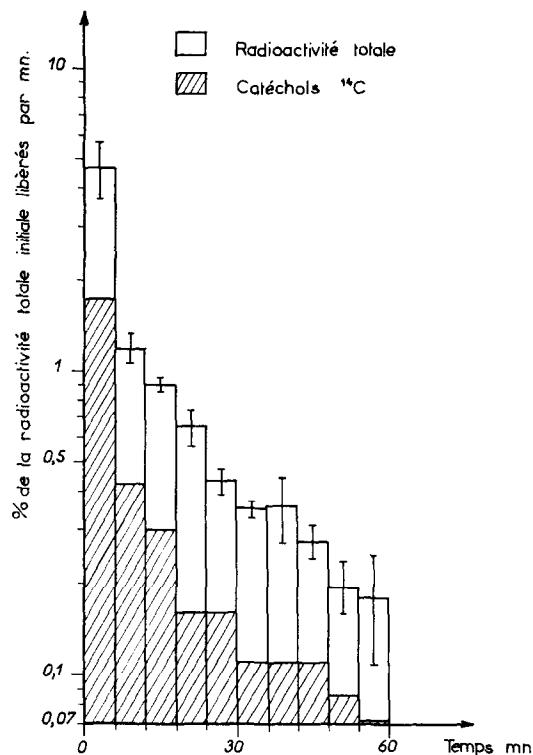


FIG. 2. Libération spontanée de la radioactivité à partir de l'aorte isolée du rat ayant reçu une injection intraveineuse de noradrénaline ^{14}C ($20\mu\text{c}$, $165\mu\text{g}$) 2,5 min avant sacrifice. (Moyennes de 5 expériences).

jusqu'à la fin de l'expérience. La perte de radioactivité par l'aorte au cours du temps de répartit de la manière suivante : $46,3 \pm 6,0$ pour cent sont libérés pendant la première demi-heure (dont 28,2 pour cent pendant les six premières minutes) et $8,3 \pm 1,3$ pour cent au cours de la seconde demi-heure. Il reste dans l'aorte à la fin de la perfusion $45,4 \pm 5,7$ pour cent de la radioactivité initiale.

La courbe de libération des catéchols ^{14}C (Fig. 2) suit approximativement celle de la radioactivité totale : le taux de noradrénaline ^{14}C représente en moyenne 35 pour cent de l'activité totale.

2.2. *Influence de l'éphédrine sur la libération spontanée (a) affusion unique prolongée.* Trente minutes après l'installation de la perfusion par du liquide de Krebs seul, la préparation est soumise pendant trente autres minutes à la perfusion par du liquide de Krebs additionné de 1 g pour 1000 de chlorhydrate d'éphédrine. Nous avons vérifié dans des expériences effectuées par ailleurs que l'alcaloïde à cette concentration possède une action contracturante sur la préparation d'aorte isolée de Rat suivant la technique décrite par l'un de nous en collaboration avec Nguyen Ba Muoi.¹⁰ La Fig. 3 illustre les résultats que nous avons obtenus dans ces expériences.

Au cours de la première demi-heure, la libération spontanée représente $42,0 \pm 4,2$ pour cent de la radioactivité initiale, puis en présence d'éphédrine durant la deuxième demi-heure, $13,0 \pm 0,9$ pour cent sont mobilisés. Cette quantité est significativement différente ($P < 0,1$) de celle qui est libérée spontanément (Fig. 1) pendant le même laps de temps en l'absence d'éphédrine. La présence d'éphédrine provoque au cours

des trois premières minutes un accroissement de la radioactivité particulièrement net, attribuable à la mobilisation de noradrénaline ^{14}C , car, la quantité de noradrénaline ^{14}C libérée par minute et exprimée en pourcentage de la radioactivité initiale passe alors de 0,19 à 0,62 pour cent soit un coefficient d'augmentation égal à 3,3.

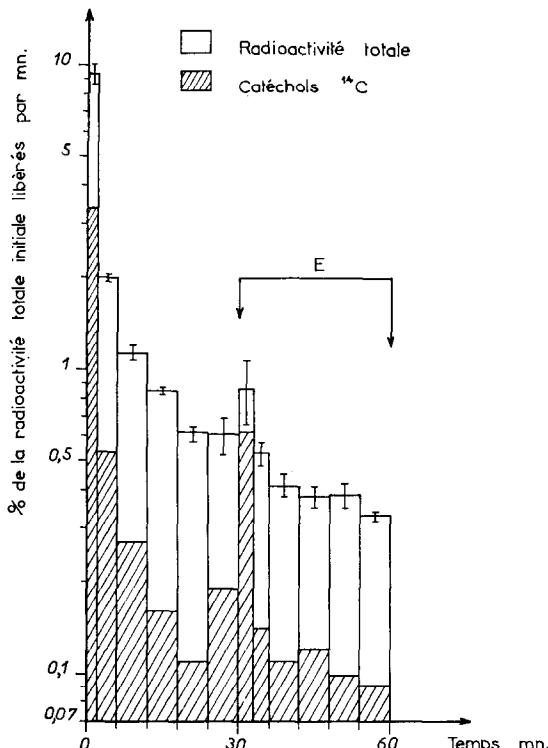


FIG. 3. Action de l'éphédrine sur la libération spontanée de la radioactivité à partir de l'aorte isolée de rats ayant reçu une injection intraveineuse de noradrénaline ^{14}C . (mêmes conditions que Fig. 1). En E: perfusion *in vitro* durant trente minutes d'une solution d'éphédrine (chlorhydrate) à la concentration de 10^{-3} (Moyennes de 5 expériences).

(b) *affusions répétées*. A quatre reprises, l'aorte est soumise à l'action de l'éphédrine pendant une minute et demie (Fig. 4). A chaque affusion correspond une augmentation de la libération de radioactivité. Le phénomène est donc reproductible.¹ Ici encore la mobilisation porte également sur la noradrénaline et, pour la moyenne des quatre affusions, la quantité libérée par minute sous l'influence de l'éphédrine est multipliée par le coefficient 2,8.

(c) *importance du phénomène de libération*. L'éphédrine provoque une augmentation de la libération spontanée de la radioactivité à partir des parois de l'aorte mais cette action ne porte en définitive que sur une très faible partie de la radioactivité totale fixée dans l'organe. Le tableau 2 montre la distribution de la radioactivité en fonction du temps pour les trois séries d'expériences. On peut voir que la radioactivité qui reste dans l'organe à la fin de la perfusion est pratiquement identique dans tous les cas, et comprise entre $41,5 \pm 3,4$ et $45,4 \pm 5,7$ pour cent.

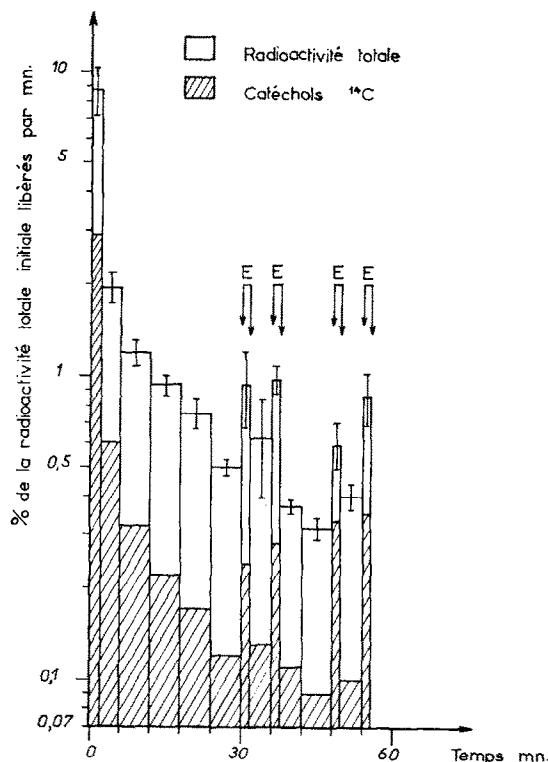


FIG. 4. Action de doses répétées d'éphédrine sur la libération spontanée de la radioactivité à partir de l'aorte isolée du rat ayant reçu une injection intraveineuse de noradrénaline ^{14}C (mêmes conditions que Fig. 1). En E: perfusion *in vitro* durant 1,5 min d'une solution d'éphédrine (chlorhydrate) à la concentration de 10^{-3} (Moyennes de 6 expériences).

TABLEAU 2. DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITE EN FONCTION DU TEMPS (EXPRIMEE EN POURCENTAGE DE LA RADIOACTIVITE INITIALE)

	I	II	III
Quantité libérée pendant les 30 premières minutes de perfusion	$46,3 \pm 6,0$	$42,0 \pm 4,2$	$45,3 \pm 4,2$
Quantité libérée entre le temps 30 minutes et celui qui correspond à la fin de la perfusion*	$8,3 \pm 1,3$	$13,0 \pm 0,9$	$13,2 \pm 1,2$
Quantité restant dans l'aorte après la fin de la perfusion	$45,4 \pm 5,7$	$45,0 \pm 4,5$	$41,5 \pm 3,4$

- I. Témoin (libération spontanée)
 II. Affusion unique et prolongée d'éphédrine
 III. Affusions répétées d'éphédrine

* Pour les séries d'expériences I et II la perfusion est arrêtée au temps 60 min, pour la série III au temps 55,5 min.

DISCUSSION

Après injection intraveineuse de $20 \mu\text{c}$ de DL noradrénaline ^{14}C , l'aorte de rat se trouve chargée en catécholamines ^{14}C , dont le taux (environ $5 \text{ m}\mu\text{c}$) varie d'un échantillon à l'autre, à la suite du prélèvement et de la dissection fine. Cette variation est

attribuable à une fuite inégale de catécholamines ^{14}C des espaces extracellulaires que nous avons trouvés particulièrement importants dans l'aorte (volume de diffusion de ^{82}Br : $742 \pm 13 \mu\text{l}$ par gramme de poids frais). De plus le dépôt ne semble pas se faire dans un seul compartiment. En effet, on observe, au cours de la perfusion, une libération biphasique. Une partie des catécholamines, très labile, est élueée rapidement et cette fraction correspond vraisemblablement à une localisation extra-cellulaire. Puis la libération spontanée se poursuit à vitesse constante jusqu'à la fin de la première heure. L'éphédrine, administrée durant cette période, augmente la vitesse de libération de la noradrénaline ^{14}C . Cette libération présente les caractéristiques suivantes: (1) elle est immédiate et contemporaine de l'action physiologique; (2) elle est maximale durant les trois premières minutes qui suivent l'administration d'éphédrine; (3) elle est transitoire et peut être reproduite au cours d'affusions répétées; (4) elle ne porte que sur une faible partie de la totalité des catécholamines marquées présentes dans l'aorte. L'action déplétrice est donc limitée à une certaine fraction du médiateur. Il a été bien établi, pour le cœur, que la noradrénaline stockée dans les terminaisons nerveuses sympathiques n'est pas répartie d'une manière 'homogène' mais localisée dans différents 'compartiments' caractérisés par des vitesses de renouvellement distinctes et inégalement résistants à l'égard de l'action déplétrice de certains agents pharmacologiques.¹¹ Ainsi l'injection intraveineuse d'éphédrine chez le chien entraîne, associée à l'hypertension, une augmentation de la teneur en noradrénaline du sang veineux coronarien¹² alors que la teneur en catécholamines du sang artériel fémoral n'est pas affectée.¹³ Cette observation semble indiquer que la noradrénaline libérée par l'éphédrine est rapidement inactivée dans les conditions normales par fixation tissulaire ou par dégradation métabolique.

Cependant notre étude démontre que l'éphédrine mobilise également les catécholamines des vaisseaux. Elle permet d'étayer l'hypothèse selon laquelle l'éphédrine agit par l'intermédiaire d'un médiateur tissulaire. Cette idée a été émise après que l'on eut observé une diminution des actions de certaines amines sympathomimétiques (éphédrine, tyramine) à la suite d'une dénervation sympathique,^{14, 15} ou d'un traitement par la réserpine.¹ Pleinement vérifiée dans le cas de la tyramine, considérée¹⁶ comme le type des amines sympathomimétiques à action indirecte, agissant par libération de noradrénaline, cette hypothèse n'est pas entièrement applicable à l'éphédrine pour laquelle apparaissent, par rapport à la tyramine, des différences sensibles qui l'ont fait classer dans le groupe des amines sympathomimétiques 'mixtes'¹⁶ à action directe et indirecte. Nos résultats mettent en évidence cette composante indirecte de l'action de l'éphédrine.

CONCLUSION

L'aorte, prélevée sur des rats préalablement soumis à une injection intraveineuse de DL noradrénaline ^{14}C , est perfusée par du liquide de Krebs bicarbonaté dans une enceinte à atmosphère humide et à température constante (37°). L'éphédrine augmente significativement la quantité de noradrénaline ^{14}C libérée spontanément à partir des parois vasculaires. Cette augmentation est immédiate et contemporaine de la contraction du vaisseau mais elle ne porte que sur une faible proportion des catécholamines marquées présentes dans l'aorte. Ces faits apportent la démonstration directe d'une libération de pyrocatecholamines tissulaires par l'éphédrine mécanisme qui a été proposé pour expliquer une partie de l'action de cette substance.

BIBLIOGRAPHIE

1. J. H. BURN et M. J. RAND, *J. Physiol.* **144**, 314 (1958).
2. G. VALETTE et C. MASSE, *C. r. Soc. Biol.* **153**, 260 (1959).
3. G. VALETTE et C. MASSE, *C. r. Soc. Biol.* **154**, 318 (1960).
4. G. VALETTE et C. MASSE, *J. Physiol. Paris* **52**, 240, (1960).
5. G. VALETTE, Y. COHEN et H. HUIDOBRO, *J. Physiol Paris* **52**, 238 (1960).
6. NGUYEN BA MUOI, Thèse de Doct. Sc. Nat. Etude du phénomène de tachyphylaxie. Action de l'éphédrine sur les artères isolées. A.G.E.M.P. ed. Paris (1964).
7. L. PICHAT, *Proceedings of the Second United Nations International Conference on the Peaceful uses of Atomic Energy*, Geneva 1958, **20**, 82, United Nations, New York (1958).
8. R. F. FURCHGOTT et S. BHADRAKOM, *J. Pharmac.* **108**, 129 (1953).
9. L. G. WHITBY, J. AXELROD et H. WEIL MALHERBE, *J. Pharmac.* **132**, 193 (1961).
10. G. VALETTE et NGUYEN BA MUOI, *Ann. pharm. fr.* **20**, 577 (1962).
11. I. J. KOPIN, *Pharmac. Rev.* **16**, 179 (1964).
12. C. A. CHIDSEY, D. C. HARRISON et E. BRAUNWALD, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **109**, 488 (1962).
13. N. S. SKINNER, J. P. GILMORE, *Arch. int. Pharmacodyn. Ther.* **151**, 159 (1964).
14. J. H. BURN, *J. Pharmac.* **46**, 75 (1932).
15. A. FLECKENSTEIN, J. H. BURN, *Br. J. Pharmac.* **8**, 69 (1953).
16. U. TRENDELENBURG, *Pharmac. Rev.* **15**, 225 (1963).