

BBA 75052

INDEPENDANCE DES VARIATIONS DE PERMEABILITE A L'EAU ET AU SODIUM PRODUITES PAR LES HORMONES NEUROHYPOPHYSAIRES SUR LA VESSIE DE GRENOUILLE

J. BOURGUET ET F. MOREL

Département de Biologie, Commissariat à l'Energie Atomique, Gif-sur-Yvette (France)

(Reçu le 28 février 1967)

SUMMARY

Evidence of independent action of neurohypophyseal peptides on water permeability and sodium active transport in frog urinary bladder

Both water permeability and sodium active transport are increased in frog urinary bladder by neurohypophyseal peptides. Assays of hormone analogs on various biological structures indicate, however, that these two effects are not strictly correlated and that they could result from two separate actions of the hormone.

In the present study, natriferic and hydrosmotic activities have been measured simultaneously and a comparison of relative activities of oxytocin and arginine vasotocin achieved.

Doses of oxytocin and arginine vasotocin that produce the same increment of net water flow, induce significantly different increases in short-circuit current. This fact implies a dissociation of the two effects which probably occurs at the hormone receptor level.

INTRODUCTION

Un argument en faveur de l'existence de deux actions indépendantes des peptides neurohypophysaires sur la perméabilité à l'eau et aux électrolytes de la peau et de la vessie des amphibiens a été tiré précédemment¹ de la comparaison des activités relatives de l'ocytocine et de certains de ses analogues sur ces deux perméabilités.

La mise en évidence pour certains couples de peptides de rapports d'activités différents pour l'action sur le courant de court-circuit (effet natriferique) et pour celle sur le flux net d'eau (effet hydrosmotique) implique, en effet, une dissociation de ces deux actions, et ce, très probablement, dès le niveau du récepteur de l'hormone.

Dans ce travail¹ cependant, la détermination des activités natriferiques et hydrosmotiques avait été réalisée dans des conditions biologiques différentes et il restait possible que cette différence fût à l'origine des résultats observés^{1,2}. Nous

avons dans le présent travail, grâce à la mise au point d'une technique adéquate, procédé à la mesure simultanée des deux activités biologiques pour un couple de peptides: l'arginine vasotocine et l'ocytocine. Les résultats obtenus confirment nos observations antérieures et excluent toute possibilité d'erreur due aux conditions expérimentales.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce travail a été effectué sur la vessie isolée de *Rana esculenta* L. Les animaux, qui proviennent de Vendée sont conservés dès leur arrivée au laboratoire dans de l'eau courante maintenue à $2 \pm 2^\circ$.

La vessie, préalablement remplie de Ringer est isolée et rapidement montée à la manière d'un diaphragme (surface 1.75 cm^2) entre deux chambres coniques en lucite. Sa face séreuse repose sur une toile en nylon (diamètre de fil, 45μ ; mailles, $60 \mu \times 60 \mu$).

La chambre séreuse (volume 5 ml) est emplie de solution de Ringer (Na^+ , 114.5 mequiv/l; K^+ , 5 mequiv/l; Ca^{2+} , 2 mequiv/l; Cl^- , 119 mequiv/l; HCO_3^- , 2.5 mequiv/l; pH 8.1), oxygénée par barbottage d'air. Sauf indication contraire dans le texte, la chambre muqueuse est emplie d'une solution hypotonique (Na^+ , 7.5 mequiv/l; K^+ , 5 mequiv/l; Ca^{2+} , 2 mequiv/l; Cl^- , 12.5 mequiv/l; HCO_3^- , 2.5 mequiv/l). Le mélange de cette solution qui n'est pas gazé est assuré au moyen d'un agitateur magnétique. Dans tous les cas, le montage est suivi d'une période d'équilibration (environ 1 h et 30 min) pendant laquelle la différence de potentiel et le flux net d'eau spontanés sont enregistrés. Toutes les expériences sont faites à température ambiante.

Activité hydrosmotique

L'activité hydrosmotique est estimée à partir des variations du flux net d'eau provoquées. La technique de mesure de ce flux a été décrite précédemment³. Il s'agit d'une mesure volumétrique comportant l'enregistrement de la quantité d'eau réinjectée dans la chambre muqueuse pour compenser le flux net d'eau à travers la préparation. Cette technique fournit une mesure quasi continue (un point par minute) et permet donc de suivre de manière précise la cinétique de réponse à l'hormone.

Activité natriférique

Cette activité est estimée par les variations du courant de court-circuit⁴ que provoquent les peptides. La technique d'enregistrement utilisée est celle décrite par MOREL, MAETZ ET LUCARAIN⁵. Les solutions baignant les deux faces étant différentes, pour éliminer toute différence de potentiel à ce niveau, la jonction avec les électrodes au calomel a été assurée au moyen d'un capillaire rempli d'une solution de KCl saturée dont l'extrémité est orientée vers le haut (diamètre, environ 100μ).

Mesure du flux entrant de sodium

Les mesures du flux entrant de sodium ont été effectuées à l'aide de ^{24}Na .

Protocole expérimental et calcul des activités

Les expériences ont été conduites de manière à définir pour chaque préparation des doses sous maximales d'arginine vasotocine et d'ocytocine entraînant un accroissement identique du flux net d'eau. Le rapport des activités natrifériques des deux peptides est ensuite calculé en tenant compte des accroissements correspondants du courant de court-circuit.

Le courant de court-circuit présente fréquemment une dérive au cours du temps. Dans ce cas, sa valeur de base est estimée par interpolation.

Peptides utilisés

Les deux peptides utilisés dans ce travail, l'ocytocine (Syntocinon Sandoz) et l'arginine vasotocine ont été obtenus par synthèse* et employés à des concentrations variant de 0.625 à 10 milli-unités hydrosmotiques par ml (mU_H/ml).

RÉSULTATS

Relation entre le flux entrant de sodium et le courant de court-circuit

On sait que le courant de court-circuit mesuré à travers une préparation dont les deux faces sont baignées par une solution de Ringer constitue une mesure fidèle du flux net de sodium qui la traverse^{4,6}. Ce flux net représente la somme algébrique d'un flux entrant, stimuable par l'hormone, et correspondant à un transport actif, et d'un flux sortant, non influencé par l'hormone. Nos expériences ayant été faites en présence d'un milieu muqueux fortement hypotonique, nous avons recherché quelle était la relation entre le courant de court-circuit et le flux entrant de sodium en présence et en absence d'ocytocine.

Les résultats de 26 périodes expérimentales de 10 min sont rapportés dans la Fig. 1. Il y apparaît que même si le courant de court-circuit présente généralement

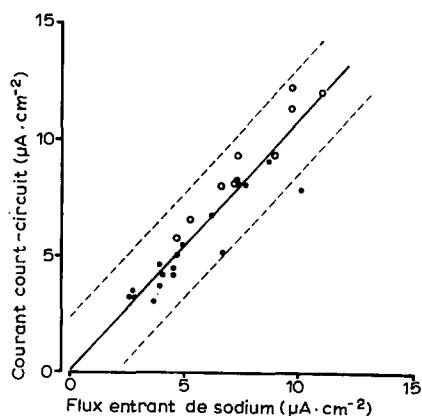


Fig. 1. Relation entre le flux entrant de sodium, et le courant de court-circuit mesurés en présence (○) et en absence d'ocytocine (●) sur la vessie de *Rana esculenta* (milieu séreux, Ringer; milieu muqueux, Ringer dilué 20 fois). $y = 0.084 + 1.078 x$.

* Nous tenons à remercier M. le Dr Boissonas de la maison Sandoz qui a mis gracieusement ces deux peptides à notre disposition.

une valeur plus élevée que ne le laisserait prévoir le flux entrant de sodium mesuré simultanément, il en représente, néanmoins, aussi bien en présence qu'en absence d'ocytocine, une estimation satisfaisante.

Comparaison des cinétiques d'accroissement du flux net d'eau en présence d'arginine vasotocine et d'ocytocine

Certains résultats expérimentaux indiquent que le maximum de l'action est obtenu plus rapidement après ocytocine qu'après arginine vasotocine (voir par exemple Fig. 4). Nous avons recherché dans une série d'expériences si cette différence était significative. Les doses de peptide ont été choisies de manière à entraîner des réponses sous maximales et d'intensités comparables pour l'arginine vasotocine et l'ocytocine (accroissements moyens observés: arginine vasotocine, $1.00 \pm 0.08 \mu\text{l}/1.75 \text{ cm}^2$ par min; ocytocine, $1.02 \pm 0.11 \mu\text{l}/1.75 \text{ cm}^2$ par min). Les valeurs moyennes de 11 essais avec ces deux peptides sont reprises dans la Fig. 2. Ces moyennes ont été calculées après transformation des accroissements instantanés en pour cent de l'accroissement maximal observé pour la stimulation considérée. On y voit que les variations de flux net d'eau provoquées par l'arginine vasotocine se développent près de 2 fois plus lentement que celles provoquées par l'ocytocine.

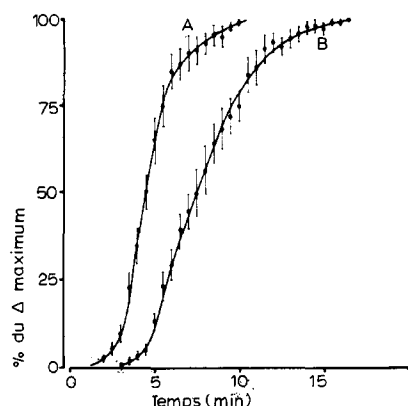


Fig. 2. Evolution du flux net d'eau après stimulation par l'ocytocine (A) et l'arginine vasotocine (B). Les doses utilisées (addition au temps zéro) sont déterminées de manière à obtenir des accroissements d'intensités comparables. Les valeurs représentées sont des moyennes de 11 essais, affectées de leur erreur. Elles ont été calculées après transformation pour chaque stimulation hormonale, des accroissements instantanés en pour cent de l'accroissement maximal observé.

Aucune comparaison systématique des cinétiques de variation du courant de court-circuit sous l'influence de l'arginine vasotocine et de l'ocytocine n'a été faite. Les résultats observés au cours de l'enregistrement simultané des deux effets ne se prêtent pas à cette analyse puisqu'en effet les accroissements observés ont toujours été plus élevés pour l'ocytocine que pour l'arginine vasotocine.

Comparaison des cinétiques d'accroissement du courant de court-circuit et du flux net d'eau sous ocytocine

Une des conséquences possibles de l'existence de récepteurs distincts pour

chacun des effets biologiques est l'apparition d'un asynchronisme dans le développement des actions.

Nous l'avons recherchée sur cinq préparations pour lesquelles les cinétiques d'accroissement du flux net d'eau et du courant de court-circuit ont été déterminées simultanément. Dans cette série, les vessies ont été montées en présence de solution de Ringer diluée de moitié du côté muqueux et court-circuitées dès leur montage. La stimulation a été réalisée au moyen de doses sous maximales d'ocytocine.

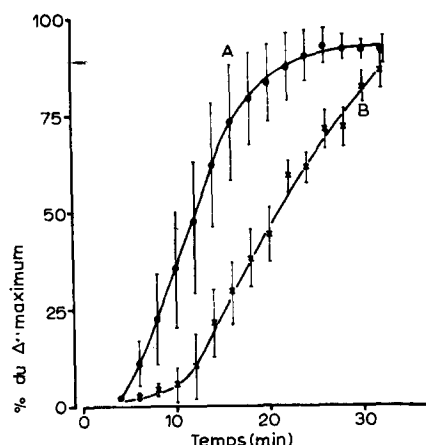


Fig. 3. Evolution du courant de court-circuit (●) et du flux net d'eau (×) après stimulation par l'ocytocine (adjonction au temps zéro). Ces moyennes de 5 essais, affectées de leur erreur, ont été calculées après transformation, pour chaque stimulation hormonale, des accroissements instantanés en pour cent de l'accroissement maximal observé.

La Fig. 3 représente l'évolution au cours du temps de l'accroissement du courant de court-circuit et du flux net d'eau après addition d'une dose d'hormone au temps zéro. Il s'agit de valeurs moyennes (5 expériences) et les augmentations de flux ont été exprimées en % de l'augmentation maximale observée au cours de la réaction considérée. On y voit que l'action de l'hormone sur le courant de court-circuit se développe plus rapidement que celle sur le flux net d'eau, le temps nécessaire pour atteindre 50% de l'accroissement maximal étant de 6.2 ± 1.21 min pour le courant de court-circuit et 10.2 ± 0.87 pour l'eau.

Rapport des activités natrifériques de l'ocytocine et l'arginine vasotocine à activité hydrosmotique égale

La Fig. 4 représente des enregistrements du courant de court-circuit (partie supérieure) et du flux net d'eau (partie inférieure) obtenus au cours d'une expérience de mesure simultanée.

Trois doses d'hormones ont été ajoutées successivement ($625 \mu\text{U}_\text{H}/\text{ml}$), et maintenues au contact de la face séreuse de la préparation jusqu'à ce que le flux net d'eau et le courant de court-circuit atteignent leur valeur maximale. La solution de Ringer du compartiment séreux est alors renouvelée (interruption des tracés) et la dose suivante d'hormone n'est ajoutée que lorsque les flux sont revenus à leur valeur de base. On peut constater sur cette figure que pour un accroissement donné du

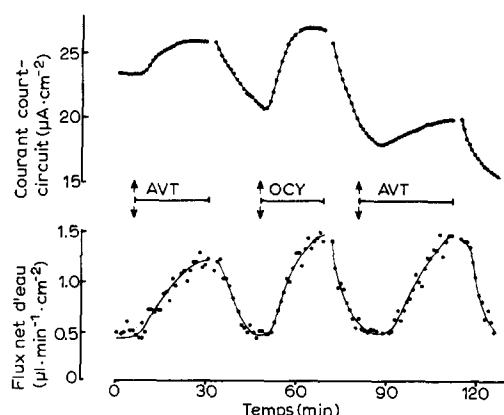


Fig. 4. Comparaison des activités relatives de l'ocytocine (OCY) et de l'arginine vasotocine (AVT). Enregistrement simultané du courant de court-circuit (tracé supérieur) et du flux net d'eau (tracé inférieur) à travers la vessie urinaire de *Rana esculenta*. La concentration en AVT a été choisie de manière à obtenir une augmentation du flux net d'eau aussi comparable que possible à celle observée pour ocytocine. L'action simultanée sur le courant de court-circuit est plus importante pour l'ocytocine que pour l'arginine vasotocine.

flux net d'eau, l'ocytocine entraîne une augmentation plus importante du courant de court-circuit que l'arginine vasotocine.

Le Tableau I rassemble les résultats obtenus sur cinq préparations différentes. A activité identique sur le flux net d'eau, l'ocytocine s'avère plus active que l'arginine vasotocine sur le courant de court-circuit. Le rapport d'activité moyen ocytocine/arginine vasotocine est de 2.58 ± 0.236 et diffère significativement de 1 ($P < 0.01$).

DISCUSSION

Le protocole expérimental adopté comporte la mesure simultanée des deux effets, natriférique et hydrosmotique.

La mesure du courant de court-circuit implique en principe l'emploi de milieux séreux et muqueux de concentrations égales pour tous les électrolytes perméants; celle du flux net d'eau impose, par ailleurs, l'existence d'une différence de pression

TABLEAU I

RAPPORT DES ACTIVITÉS NATRIFÉRIQUES DE L'OCYTOCINE ET DE L'ARGININE VASOTOCINE À ACTIVITÉ 'HYDROSMOTIQUE' ÉGALE

Expérience No.	Rapports ocytocine/arginine vasotocine successifs			Rapport moyen
205	2.30	3.50	2.50	2.78
215	1.80	3.00		2.40
245	1.73	2.00	1.79	1.84
16	3.57	2.98		3.28
26	3.09	2.12		2.60
Moyenne générale				2.58 ± 0.236 (S.E.)

osmotique entre les deux faces de la préparation. L'emploi d'un milieu séreux rendu hypertonique par l'adjonction d'une solute non-électrolytique devrait permettre de satisfaire ces deux exigences. Nous l'avons cependant évité au cours de ces expériences.

On sait, en effet, que dans ces conditions la différence de potentiel et le courant de court-circuit sont abaissés de manière importante. La vessie de *Rana esculenta* est particulièrement sensible à ces augmentations de la pression osmotique du milieu séreux et présente en outre, dans certains cas, une augmentation massive de sa perméabilité osmotique à l'eau^{7,8}.

L'emploi d'un milieu muqueux hypotonique entraîne une inégalité des concentrations du sodium et des chlorures entre les deux faces de la préparation. Cependant même dans ces conditions, il apparaît que le courant de court-circuit constitue une estimation satisfaisante du transport actif de sodium, et que l'activité hormonale mesurée correspond bien à l'activité natriférique.

Le critère d'activité retenu est la valeur de l'accroissement du flux net d'eau et du courant de court-circuit obtenu sous stimulation et l'efficacité relative des différents peptides est établie en comparant l'action sur le courant de court-circuit, de doses sous maximales choisies pour entraîner un accroissement identique du flux net d'eau.

Il convient de remarquer ici que, pour un même accroissement du flux, les actions de deux peptides peuvent présenter des cinétiques différentes. Ainsi, la cinétique de réponse à l'arginine vasotocine est significativement plus lente que celle de réponse à l'ocytocine. Peut-être cette divergence est-elle liée aux différences de concentrations de peptide utilisées, mais aucune explication définitive ne peut être donnée actuellement, et malgré cette observation, nous avons considéré que deux doses sont comparables lorsqu'elles aboutissent à un même accroissement du flux.

Dans ces limites, les résultats rapportés ici confirment que l'introduction en position 8 de la molécule d'ocytocine d'un reste arginine (arginine vasotocine) s'accompagne d'une modification inégale des activités natriférique et hydrosmotique et que les résultats obtenus précédemment¹ ne peuvent être expliqués par des différences dans les conditions expérimentales de mesure.

L'enregistrement simultané et continu des deux effets biologiques de l'hormone permet d'apporter un argument supplémentaire en faveur de leur relative indépendance. Il consiste en la mise en évidence d'une précession de l'accroissement du courant de court-circuit sur l'accroissement du flux net d'eau après addition d'hormone.

Cette dissociation des deux effets biologiques dans le temps est parfaitement compatible avec l'hypothèse d'une dualité des récepteurs de l'hormone. Elle n'en constitue cependant pas une preuve car elle pourrait également résulter de l'existence de deux effecteurs distincts, pour le sodium et pour l'eau, mais qui seraient activés à partir d'un récepteur unique de l'hormone.

Nos expériences apportent, donc, un argument supplémentaire à la thèse qui fait dépendre les variations de perméabilité à l'eau et au sodium, de deux actions indépendantes des peptides neurohypophysaires. Ils sont en accord avec d'autres observations⁹⁻¹², qui impliquent également une dissociation de ces processus, dont la fréquente association avait conduit à penser qu'ils résultaient d'une seule action^{13,14}.

On a proposé récemment l'intervention du 3',5'-adénosine monophosphate

cyclique comme intermédiaire d'action de l'hormone¹⁵. Dans cette hypothèse, il faudrait pour expliquer nos résultats, admettre la production du 3',5'-adénosine monophosphate cyclique à deux endroits distincts de la cellule. Ce schéma, déjà proposé par PETERSEN ET EDELMAN¹¹ est d'ailleurs en accord avec le principe d'une élévation locale de la concentration du 3',5'-adénosine monophosphate cyclique, dans la cellule¹⁶. Ils pourraient également se comprendre si les deux effets de l'hormone se produisaient dans des cellules différentes.

RÉSUMÉ

Les peptides neurohypophysaires augmentent simultanément la perméabilité à l'eau et au sodium de la vessie des amphibiens. La comparaison des activités biologiques d'analogues de structure de l'hormone indique cependant que ces deux effets ne sont pas strictement liés et qu'ils pourraient résulter de deux actions séparées de ces peptides.

Nous avons, dans le présent travail, au cours de mesures simultanées des activités hydrosmotique et natriférique, comparé les activités respectives de l'ocytocine et de l'arginine vasotocine. Nos résultats montrent que des concentrations de ces deux peptides, qui provoquent le même accroissement du flux net d'eau, entraînent des variations significativement différentes du courant de court-circuit. Cette observation implique une dissociation des deux effets, qui est vraisemblablement réalisée dès le niveau du récepteur de l'hormone.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. BOURGUET ET J. MAETZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 552.
- 2 J. ORLOFF ET J. S. HANDLER, *Am. J. Med.*, 36 (1964) 686.
- 3 J. BOURGUET ET S. JARD, *Biochim. Biophys. Acta*, 88 (1964) 442.
- 4 H. H. USSING, *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, 8 (1954) 407.
- 5 F. MOREL, J. MAETZ ET C. LUCARAIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 28 (1958) 619.
- 6 A. LEAF, J. ANDERSON ET L. B. PAGE, *J. Gen. Physiol.*, 41 (1958) 657.
- 7 P. J. BENTLEY, *Comp. Biochem. Physiol.*, 12 (1964) 233.
- 8 H. H. USSING, *Acta Physiol. Scand.*, 63 (1965) 141.
- 9 P. J. BENTLEY, *J. Endocrinol.*, 18 (1959) 327.
- 10 P. J. BENTLEY, *J. Endocrinol.*, 21 (1960) 161.
- 11 M. J. PETERSEN ET I. S. EDELMAN, *J. Clin. Invest.*, 43 (1964) 583.
- 12 N. S. LICHTENSTEIN ET A. LEAF, *J. Clin. Invest.*, 44 (1965) 1328.
- 13 V. KOEFOED-JOHNSEN ET H. H. USSING, *Acta Physiol. Scand.*, 28 (1953) 60.
- 14 B. ANDERSEN ET H. H. USSING, *Acta Physiol. Scand.*, 39 (1957) 228.
- 15 J. ORLOFF ET J. S. HANDLER, *J. Clin. Invest.*, 41 (1962) 702.
- 16 J. S. HANDLER, R. W. BUCHTER, E. W. SUTHERLAND ET J. ORLOFF, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 4524.

Biochim. Biophys. Acta, 135 (1967) 693-700