

CINÉTIQUE DE LA PERMÉABILISATION DE LA VESSIE DE GRENOUILLE PAR L'OCYTOCINE. RÔLE DU 3',5'-ADÉNOSINE MONOPHOSPHATE CYCLIQUE

J. BOURGUET

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

(Reçu le 31 mai, 1967)

(Manuscrit revisé reçu le 22 septembre, 1967)

SUMMARY

Kinetic analysis of the effect of oxytocin on the water permeability of frog bladder. Role of cyclic AMP

(1) Water permeability of isolated frog urinary bladder is considerably increased by oxytocin, theophyllin and cyclic AMP, when animals have been previously maintained at 22°. When they have been maintained at 2°, theophyllin alone has no effect, but still strongly potentiates the effects of oxytocin and cyclic AMP.

(2) Kinetic analysis of the responses shows that the time course of net water flux increase is similar in the three types of stimulation.

(3) These results are in good agreement with the hypothesis of mediation in the action of the hormone by cyclic AMP. They suggest that the rate-limiting step in the overall response to hormone must occur after the increase of cyclic AMP concentration.

INTRODUCTION

On sait que l'ocytocine peut augmenter de manière importante la perméabilité à l'eau de la vessie des amphibiens, et amplifier ainsi, le flux net d'eau qui, en présence d'un gradient de pression osmotique, traverse la préparation.

Cette action de l'hormone sur le flux net d'eau n'est pas instantanée. Si la réaction se déroule à température ambiante, son addition est suivie d'un temps de latence de plusieurs minutes et le flux n'augmente ensuite que de manière progressive pour atteindre son maximum au bout de 10 à 15 min. Au contraire, une variation beaucoup plus rapide du flux est observée lorsqu'on modifie la différence de pression osmotique entre les deux faces d'une préparation préalablement perméabilisée par l'hormone¹. Le facteur limitant, doit donc être recherché parmi les étapes aboutissant à cette perméabilisation. Enfin, la valeur élevée observée pour le Q_{10} (Bibl. 1) de l'ensemble du processus rend peu probable l'intervention d'un facteur limitant de nature physique, telle la diffusion par exemple, et suggère, au contraire, celle d'une réaction à énergie d'activation élevée.

Dans ce travail, nous avons recherché si l'accumulation d'un éventuel inter-

médiaire d'action de l'ocytocine ne pouvait constituer l'étape limitant la cinétique de réponse.

De nombreux arguments expérimentaux indiquent que le 3',5'-adénosine monophosphate cyclique (3',5'-AMP cyclique) pourrait jouer un tel rôle d'intermédiaire d'action dans le cas des neuropeptides.

(1) Le 3',5'-AMP cyclique et la théophylline qui en inhibe² la destruction intracellulaire par la phosphodiesterase³ sont capables de reproduire l'action de la vasopressine sur la vessie urinaire de *Bufo marinus*^{4,5}. L'accroissement du flux net d'eau qu'ils produisent est comparable à celui qu'entraîne l'hormone. Cet accroissement est réversible et n'est observé que lors de l'addition des produits au milieu séreux.

(2) La vasopressine, comme la théophylline, entraîne une augmentation de la concentration tissulaire en AMP cyclique^{6,7}.

(3) Ces mêmes substances entraînent une activation de la phosphorylase⁸ comparable à celle observée sur de nombreux tissus sous l'influence de l'AMP cyclique.

Nous nous sommes donc attachés à déterminer dans quelle mesure ces résultats pouvaient être étendus à l'action de l'ocytocine sur la vessie de *Rana esculenta* et à rechercher si l'existence de cette étape intermédiaire pouvait expliquer la cinétique de réponse observée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Toutes les expériences ont été effectuées sur la vessie isolée de *Rana esculenta*. Les animaux ont été conservés dès leur arrivée au laboratoire dans l'eau courante à $2^\circ \pm 2^\circ$. Dans certains cas, ils ont subi une adaptation de quelques jours (minimum 24 h) à température de $22^\circ \pm 2^\circ$.

Toutes les expériences ont été faites à la température ambiante. La technique de mesure du flux net d'eau a été décrite précédemment¹⁰.

Les milieux suivants ont été utilisés: milieu séreux: Na^+ , 114.5 méquiv/l; K^+ , 5 méquiv/l; Ca^{2+} , 2 méquiv/l; Cl^- , 119 méquiv/l; HCO_3^- , 2.5 méquiv/l; pH 8.1. Milieu muqueux: Na^+ , 7.5 méquiv/l; K^+ , 5 méquiv/l; Ca^{2+} , 2 méquiv/l; Cl^- , 12.5 méquiv/l; HCO_3^- , 2.5 méquiv/l. Seul le milieu séreux est oxygéné, par barbotage d'air.

Quoiqu'il ne s'agisse pas d'une hormone des amphibiens, c'est l'ocytocine de synthèse, peptide disponible commercialement (Syntocinon, Sandoz), qui a été utilisée dans tous les cas.

Le 3',5'-AMP cyclique provenait des Laboratoires Schwartz, Bioresearch Inc. (Lot 66.02); la théophylline, des Laboratoires Serlabo, Paris.

RÉSULTATS

Action de la théophylline sur le flux net d'eau

Effet propre. Influence de la température d'adaptation. L'effet propre de la théophylline, ajoutée à concentration 10^{-3} M au milieu séreux, a été recherché sur le flux net d'eau, sur 28 préparations.

Parmi ces vessies, 6 provenaient d'animaux maintenus à la température de 2° . Aucune d'entre elles n'a présenté d'augmentation du flux net d'eau sous l'influence de la théophylline, dans des conditions où cependant cette substance potentialise

l'action de l'hormone. Les 22 autres provenaient d'animaux accoutumés à 22°. Une seule d'entre elles n'a pas répondu à la théophylline (10^{-3} M), les 21 autres ont présenté une augmentation significative du flux net d'eau en présence de concentrations variant de 0.2 à $1 \cdot 10^{-3}$ M. L'intensité des réponses à l'ocytocine ($2.2 \cdot 10^{-9}$ M) et à la théophylline (10^{-3} M) a été comparée sur 12 préparations. Les accroissements moyens ont été respectivement de 1.183 ± 0.23 pour l'ocytocine et de 1.33 ± 0.22 pour la théophylline, et aucune corrélation n'est obtenue entre les intensités des accroissements observés au cours de ces deux types de stimulations sur les différentes préparations.

Interaction entre la théophylline et l'ocytocine. Une interaction importante peut être observée entre ces deux substances dans leur comportement sur le flux net d'eau. Elle est particulièrement nette sur les préparations provenant d'animaux adaptés aux basses températures, et les résultats rapportés ici ne concernent que ce groupe.

La Fig. 1 en illustre un exemple. Elle représente successivement les actions propres de l'ocytocine, de la théophylline ainsi que l'influence de la superposition de ces deux substances. Alors que l'ocytocine augmente de manière significative, mais très faible, le flux net d'eau, la théophylline, même à cette concentration élevée ne

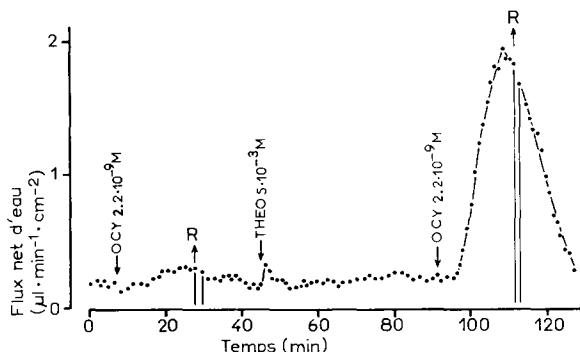


Fig. 1. Potentialisation par la théophylline (THEO) de l'action de l'ocytocine (OCY) sur le flux net d'eau. L'addition au milieu sérique de l'ocytocine ou de la théophylline est indiquée par des flèches. Leur rinçage est marqué par une interruption de l'enregistrement (traits verticaux).

TABLEAU I
INTERACTION ENTRE LA THÉOPHYLLINE ET L'OCYTOCINE

Expérience No.	Théophylline		Ocytose		Théophylline + ocytose		Rapport $III/(I+II)$
	Dose (M)	I	Dose (M)	II	Dose (M)	Dose (M)	
1	10^{-3}	0	$4.4 \cdot 10^{-9}$	0.80	10^{-3}	$4.4 \cdot 10^{-9}$	3.35
2	10^{-3}	0	$2.2 \cdot 10^{-8}$	0.25	10^{-3}	$4.4 \cdot 10^{-9}$	3.75
3	10^{-3}	0	$4.4 \cdot 10^{-8}$	0.60	10^{-3}	$2.2 \cdot 10^{-8}$	1.45
	$5 \cdot 10^{-3}$	0	$2.2 \cdot 10^{-9}$	0.15	10^{-3}	$2.2 \cdot 10^{-8}$	1.65
4	10^{-3}	0	$2.2 \cdot 10^{-8}$	0.90	$5 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-9}$	2.85
					10^{-3}	$2.2 \cdot 10^{-8}$	2.60
					10^{-3}	$2.2 \cdot 10^{-8}$	3.00
							2.89
							3.33
							6.18
							± 1.66

l'affecte pas de manière significative. Par contre, en présence de théophylline, la même dose d'ocytocine entraîne une stimulation très importante du flux.

L'ensemble des résultats observés au cours des expériences de ce type est repris dans le Tableau I. En regard de chaque dose, figure l'accroissement du flux net d'eau qu'elle entraîne. La dernière colonne représente le rapport obtenu entre l'accroissement observé lorsque les deux produits sont ajoutés simultanément, et la somme des accroissements qu'ils entraînent lorsqu'ils sont administrés séparément. Le rapport moyen est de 6.18 ± 1.66 et témoigne d'une interaction importante consistant en une potentialisation de leurs effets propres.

Cinétique de réponse à la théophylline. La théophylline ne manifestant aucun effet spontané sur les préparations provenant d'animaux adaptés à basse température, les informations dont nous disposons pour ce groupe, ne concernent que les actions obtenues après traitement préalable par l'ocytocine. La Fig. 2 représente les cinétiques observées dans ces conditions par des stimulations par l'ocytocine, par la théophylline administrée à des préparations préalablement traitées par l'ocytocine, et enfin par l'ocytocine ajoutée après traitement préalable par la théophylline. Il s'agit de courbes moyennes qui ont été calculées après réduction, pour chaque stimulation, des accroissements instantanés en pour cent de l'accroissement maximal du flux net. Dans les trois cas, l'allure de la réponse est comparable.

La cinétique de réponse à la théophylline a été comparée à celle de l'ocytocine

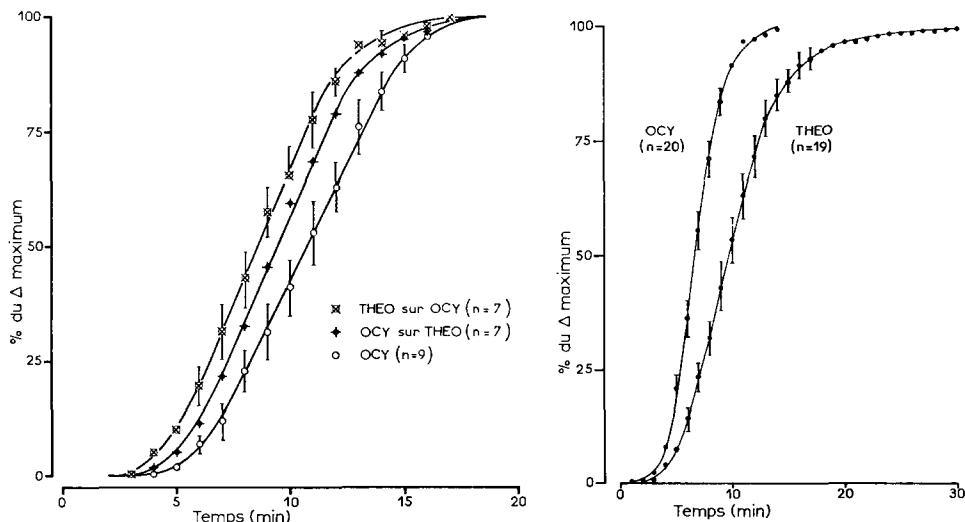


Fig. 2. Cinétiques d'accroissement du flux net d'eau lors de stimulations par l'ocytocine (OCY) (en absence et en présence de théophylline) et par la théophylline (THEO), en présence d'ocytocine. Administrée seule, la théophylline n'entraîne aucun accroissement du flux net d'eau, sur ces préparations qui proviennent d'animaux adaptés à 2°. Note: Les courbes représentées sont des valeurs moyennes affectées de leur erreur standard. L'enregistrement du flux net d'eau est habituellement interrompu lorsque la variation induite par le traitement atteint sa valeur maximale. Pour le calcul des moyennes, il est admis que cette valeur maximale reste constante dans la suite, et les accroissements instantanés sont exprimés en pour cent de cet accroissement maximal. Dans tous les cas, la substance étudiée est ajoutée au bain séreux au temps zéro.

Fig. 3. Cinétiques d'accroissement du flux net d'eau lors de stimulations par l'ocytocine (OCY) et par la théophylline (THEO) (préparations provenant d'animaux adaptés à 22°). Voir note de la légende de la Fig. 2.

sur des préparations provenant d'animaux adaptés à 22°. Les concentrations actives varient d'une préparation à l'autre, et s'étagent entre $0.25 \cdot 10^{-3}$ M et $8 \cdot 10^{-3}$ M pour la théophylline, et entre $1.1 \cdot 10^{-8}$ M et $2.2 \cdot 10^{-8}$ M pour l'ocytocine. L'allure générale de la réponse observée avec la théophylline est voisine de celle observée après ocytocine (Fig. 3), quoique le temps de réponse soit significativement plus long, le $t_{1/2}$ passant de 6.98 ± 0.25 min pour l'ocytocine, à 10.2 ± 0.54 min dans le cas de la théophylline (moyenne des $t_{1/2}$ individuels).

Relation entre l'intensité du flux net d'eau et le $t_{1/2}$. Nous avons recherché, sur 8 préparations, s'il existait une relation entre l'intensité de la réponse observée et son $t_{1/2}$. Si on compare les résultats observés sur la même préparation, il ne se dégage aucune corrélation entre ces deux paramètres. Cette absence de corrélation rend possible la comparaison des cinétiques de réponse, même pour des accroissements du flux d'intensités différentes. Nous avons recherché si la valeur plus élevée du $t_{1/2}$ observée sur certaines préparations provenait d'un allongement général du temps de réponse ou d'un accroissement du temps de latence. Dans cette dernière éventualité, les courbes individuelles pourraient être superposées par simple translation, et présenteraient toutes, ainsi que la courbe moyenne, une pente maximale identique. Nos résultats montrent que le temps nécessaire pour passer de 25 à 75 % du Δ maximum (considéré comme une estimation de la pente maximale) augmente proportionnellement au $t_{1/2}$ et qu'il en représente une fraction relativement constante. L'allongement du $t_{1/2}$ correspond donc à un allongement général du temps de réponse, et la courbe moyenne peut être calculée en déterminant pour chaque temps la moyenne des accroissements observés.

Action du 3',5'-AMP cyclique sur le flux net d'eau

Effet propre. L'action de l'AMP cyclique (ramené à pH 8.1) a été recherchée sur 11 préparations provenant d'animaux adaptés à 22°, à des concentrations variant de 10^{-3} M à 10^{-2} M.

Pour 4 d'entre elles, un accroissement souvent discret mais significatif du flux net d'eau a été observé (0.40 , 0.36 , 1.20 , 0.80 $\mu\text{l}/\text{min}/1.75\text{ cm}^2$).

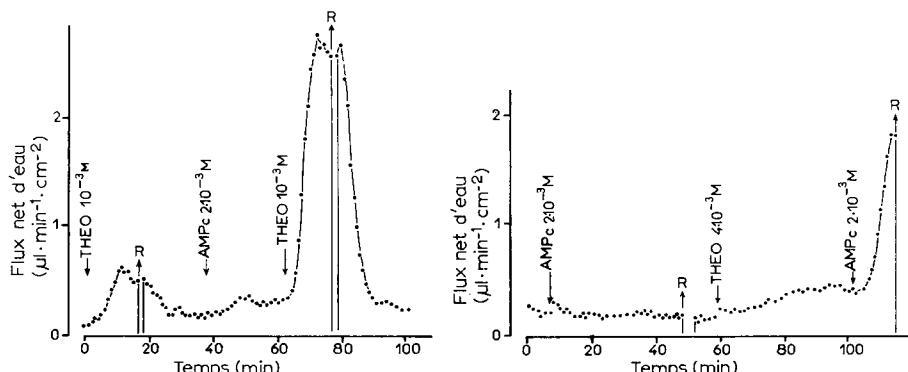


Fig. 4. Potentialisation par la théophylline (THEO) de l'action du 3',5'-adénosine monophosphate cyclique (AMPc) sur le flux net d'eau. Aux concentrations utilisées, les variations du flux net d'eau provoquées par la théophylline et l'AMP cyclique sont très discrètes. La combinaison de ces deux produits, quel que soit l'ordre de leur administration, entraîne un effet beaucoup plus important que la somme de leurs effets propres.

Interaction entre l'AMP cyclique et la théophylline. L'absence d'effet propre de l'AMP cyclique sur la plupart des préparations contraste avec l'importante interaction mise en évidence entre cette substance et la théophylline sur toutes les préparations où elle a été recherchée.

La Fig. 4 en donne deux exemples. L'action propre de l'AMP cyclique y est négligeable dans les deux cas, et celle de la théophylline de faible amplitude. Au contraire, la conjonction des deux traitements entraîne une importante stimulation, et ce, quel que soit l'ordre de leur administration. En moyenne, l'administration conjointe d'AMP cyclique et de théophylline aboutit à un accroissement 3.405 ± 0.8 fois plus important que la somme des accroissements qu'ils entraînent lors de leur administration séparée (Tableau II).

TABLEAU II
INTERACTION ENTRE L'AMP CYCLIQUE ET LA THÉOPHYLLINE

Expérience No.	Théophylline		$3',5'$ -AMP cyclique		Théophylline + AMP cyclique		Rapport $III/(I+II)$
	Dose $\times 10^{-3} M$	I	Dose $\times 10^{-3} M$	II	Dose $\times 10^{-3} M$	III	
93	1.0	0.80	2.0	0.30	1.0	2.0	4.05
113	0.25	0.80	5.0	0.36	0.25	5.0	1.80
103	0.5	1.75	3.5	0	0.50	3.5	3.00
121	0.5	0.30	3.0	0.33	0.50	3.0	2.15
111	3.0	0.40	2.0	0	3.0	2.0	2.85
101	4.0	0.40	2.0	0	4.0	2.0	2.00
71	0.5	0.20	2.0	0.80	0.5	2.0	1.60
3.405							
± 0.80							

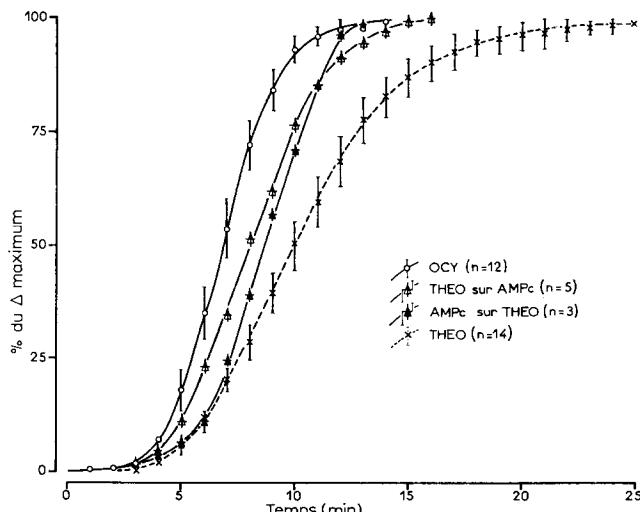


Fig. 5. Cinétiques d'accroissement du flux net d'eau lors de stimulations par l'ocytocine (OCY), la théophylline (THEO) (en absence ou en présence d'AMP cyclique (AMPc)) et l'AMP cyclique administré après traitement par la théophylline. Voir note de la légende de la Fig. 2.

Cinétique d'accroissement du flux net d'eau sous l'influence de l'AMP cyclique. Les réponses observées lorsque l'AMP cyclique a été utilisé seul sont inconstantes et de faible amplitude. Aucune conclusion définitive ne peut en être tirée quoiqu'elles indiquent que les deux types de réponses sont analogues. Les résultats obtenus au cours de stimulations combinées par la théophylline et l'AMP cyclique confirment cette indication (Fig. 5). La cinétique de réponse à la théophylline s'avère à nouveau plus lente que celle de réponse à l'ocytocine.

Au contraire, la réponse obtenue lors d'addition d'AMP cyclique à une préparation préalablement traitée par la théophylline—identique à celle observée lorsque la séquence des traitements est inversée—ne diffère pas significativement de la cinétique de réponse à l'ocytocine. Le $t_{1/2}$ dans cette série expérimentale est respectivement de 7.02 ± 0.37 min ($n = 12$) pour l'ocytocine; 10.27 ± 0.46 min ($n = 13$) pour la théophylline; 8.8 ± 0.42 min ($n = 3$) pour l'AMP cyclique après traitement préalable par la théophylline et 7.16 ± 0.57 min ($n = 5$) pour la théophylline après prétraitement par l'AMP cyclique (moyenne des $t_{1/2}$ individuels).

DISCUSSION

Les résultats rapportés ici concernant l'action de l'AMP cyclique et de la théophylline sont compatibles pour la plupart, avec l'hypothèse émise par ORLOFF ET HANDLER^{4,5} et qui fait jouer à l'AMP cyclique le rôle d'intermédiaire d'action des peptides neurohypophysaires. Comme chez *Bufo marinus*, il est possible de reproduire, dans certaines conditions au moins, l'action de l'hormone au moyen soit d'AMP cyclique, soit de théophylline.

La valeur élevée des concentrations actives d'AMP cyclique s'explique probablement par une difficulté d'accès à son site d'action^{11,12} comparativement à la capacité de destruction de ce produit.

L'absence de réponse à la théophylline chez les animaux maintenus préalablement à 2° reste à expliquer. Ces conditions d'adaptation sont particulièrement défavorables au maintien de l'équilibre de la balance hydrominérale: à basse température, le transport actif de sodium, processus nécessairement endergonique est ralenti et le maintien dans l'eau ne peut promouvoir qu'un excès des entrées d'eau. On ignore comment l'organisme s'adapte à cette situation, mais il n'est pas exclu que certaines modifications interviennent au niveau de l'épithélium vésical. Nos expériences ne permettent toutefois pas de déterminer s'il s'agit d'une diminution de la production spontanée ou sous hormone, d'AMP cyclique, d'un accroissement de sa destruction par la phosphodiesterase ou encore d'une élévation de la concentration liminaire de ce produit.

Le fait que sur ces préparations la théophylline et l'ocytocine se révèlent fortement potentialisatrices l'une de l'autre permet plusieurs conclusions. Il montre qu'il reste possible d'obtenir des stimulations importantes après adaptation à basse température. Il renforce l'hypothèse d'une intervention du système cyclasique dans le mécanisme d'action de l'hormone. Il suggère enfin que des concentrations sous-liminaires en ce qui concerne le flux net d'eau n'en exerceraient pas moins leur action primaire: stimulation de la production d'AMP cyclique par l'ocytocine et inhibition de la phosphodiesterase par la théophylline, mais qu'aucune de ces actions ne contrôlerait directement les variations de perméabilité de l'épithélium.

La comparaison des cinétiques d'accroissement du flux net d'eau observées dans les différentes conditions expérimentales permet, dans une certaine mesure, de préciser la nature du facteur limitant le déroulement de la réaction dans le temps.

En effet, si comme les arguments que nous venons de rappeler le suggèrent, l'AMP cyclique peut être considéré comme un intermédiaire d'action, son emploi et aussi celui de la théophylline permettent de court-circuiter les premières étapes de l'action de l'hormone. Or, ni la cinétique de réponse à l'AMP cyclique, ni celle de réponse à la théophylline ne sont plus rapides que la cinétique de réponse à l'ocytocine. Ceci suggère que l'étape limitant l'évolution du flux net d'eau dans le temps ne doit pas être recherchée dans les étapes précédant l'apparition de l'AMP cyclique.

L'accumulation de ce produit ne constitue probablement pas non plus le facteur limitant. Nous disposons, en effet, de trois moyens fondamentalement différents pour provoquer cette accumulation : l'addition d'AMP cyclique, la stimulation de sa production par l'hormone et enfin, l'inhibition de sa destruction au moyen de la théophylline.

Dans ces trois conditions où le nouvel équilibre résulte donc d'une action sur des processus différents, les cinétiques de réponse sont néanmoins essentiellement comparables : les différences existant entre elles sont significatives mais faibles.

Cette similitude rend peu probable, nous semble-t-il, l'intervention de l'accumulation de l'AMP cyclique comme facteur limitant. Elle suggère, au contraire, que ce rôle serait joué par une étape ultérieure.

Les différences observées restent à expliquer. Peut-être représentent-elles les 'temps de réponse' correspondant aux chaînons supplémentaires caractérisant chacune des conditions étudiées ? Les résultats rapportés ici ne permettent pas d'en décider, mais une étude plus précise pourrait en être faite à basse température, en profitant de l'allongement du temps de réaction observé dans ces conditions.

RÉSUMÉ

La perméabilité à l'eau de la vessie urinaire de grenouilles adaptées à 22° peut être fortement augmentée par l'ocytocine, la théophylline et le 3',5'-AMP cyclique. Sur les vessies provenant d'animaux adaptés à 2°, les concentrations habituellement utilisées de théophylline sont inefficaces, mais une importante potentialisation des actions de l'ocytocine et de l'AMP cyclique par la théophylline peut être mise en évidence.

L'étude cinétique des réponses observées a montré que l'évolution du flux net d'eau était comparable pour tous les types de stimulation.

Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une intervention de l'AMP cyclique dans le mécanisme d'action de l'hormone. Ils suggèrent que la réaction limitante de l'ensemble de la réponse à l'hormone est postérieure à l'élévation de la concentration de l'AMP cyclique.

REMERCIEMENTS

Nous voudrions remercier ici, F. MOREL et J. MAETZ qui nous ont fait bénéficier de leur expérience au cours de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. BOURGUET, à paraître.
- 2 R. W. BUTCHER, Jr. ET E. W. SUTHERLAND, *Pharmacologist*, 1 (1959) 63.
- 3 E. W. SUTHERLAND ET T. W. RALL, *J. Biol. Chem.*, 232 (1958) 1077.
- 4 J. ORLOFF ET J. S. HANDLER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 5 (1961) 63.
- 5 J. ORLOFF ET J. S. HANDLER, *J. Clin. Invest.*, 41 (1962) 702.
- 6 E. BROWN, D. L. CLARKE, V. ROUX ET G. H. SHERMAN, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) PC 852.
- 7 J. S. HANDLER, R. W. BUTCHER, Jr., E. W. SUTHERLAND ET J. ORLOFF, *J. Biol. Chem.*, 11 (1965) 240.
- 8 J. S. HANDLER ET J. ORLOFF, *Am. J. Physiol.*, 205 (1963) 298.
- 9 E. W. SUTHERLAND ET T. W. RALL, *Pharmacol. Rev.*, 12 (1960) 265.
- 10 J. BOURGUET ET S. JARD, *Biochim. Biophys. Acta*, 88 (1964) 442.
- 11 P. R. DAVOREN ET E. W. SUTHERLAND, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 3009.
- 12 T. POSTERNAK, E. W. SUTHERLAND ET W. F. HENION, *Biochim. Biophys. Acta*, 65 (1962) 558.

Biochim. Biophys. Acta, 150 (1968) 104-112