

BBA 75104

ANALYSE DE LA RELATION 'DOSE-EFFET BIOLOGIQUE'
POUR L'ACTION DE L'OCYTOCINE ET DE LA NORADRÉNALINE
SUR LA PEAU ET LA VESSIE DE LA GRENOUILLE

SERGE JARD, FRANÇOISE BASTIDE ET FRANÇOIS MOREL

Département de Biologie, Commissariat à l'Energie Atomique C.E.N. [Saclay, B.P. No. 2, Gif-sur-Yvette (France)]

(Reçu le 14 juin, 1967)

(Manuscrit révisé reçu le 1 septembre, 1967)

SUMMARY

Analysis of the dose-response relationships for the action of oxytocin and noradrenalin on frog skin and frog bladder

The dose-response relationships for the action of oxytocin and noradrenalin on active Na^+ transport by the isolated skin of the frog *Rana esculenta*, and for the action of oxytocin on water permeability of the isolated bladder in the same species, have been analysed.

The experimental curves are hyperbolic in the case of noradrenalin and S-shaped in the case of oxytocin for its action on the skin as well as for its action on the bladder.

Since the final effects of both oxytocin and noradrenalin result most probably from the intermediacy of 3',5'-cyclic AMP, it is suggested that the differences observed between the dose-response relationships for these two hormones indicate the existence of different mechanisms for the binding of oxytocin and noradrenalin to their specific receptor sites.

The hyperbolic curves for noradrenalin would indicate a reversible binding of the hormone to independent receptor sites. The S-shaped curves obtained for oxytocin would indicate, on the contrary, the existence of interactions between the different receptor sites.

INTRODUCTION

Dans un travail antérieur¹, nous avons montré que la noradrénaline dans un certain domaine de concentration produit des effets biologiques identiques à ceux de l'ocytocine sur la peau isolée de la grenouille: augmentation du transport de sodium et perméabilisation à l'eau. Comme pour l'action de la vasopressine sur la vessie de crapaud (*cf. bibl. 2*), le 3',5'-AMP cyclique est vraisemblablement impliqué dans l'action de l'ocytocine et de la noradrénaline sur la peau¹: la théophylline, inhibiteur de la destruction du 3',5'-AMP cyclique, potentialise également les effets de ces deux hormones et ceux du nucléotide exogène. Cependant, plusieurs arguments expéri-

Abréviation: DCI, dichloroisopropylartérénol.

mentaux suggèrent l'existence de récepteurs distincts pour les catécholamines et les hormones neurohypophysaires, en particulier l'inhibition des effets de la noradrénaline par le dichloroisopropylartérol (DCI) alors que les effets de l'ocytocine ne sont pas modifiés.

Dans ce travail, les mécanismes des interactions de l'ocytocine et de la noradrénaline avec leurs récepteurs spécifiques sont étudiés de manière indirecte en comparant: (1) les relations dose-effet biologique établies respectivement pour l'ocytocine et la noradrénaline sur la peau de la grenouille en utilisant la stimulation du transport actif de sodium (action natriférique) comme mesure de leur effet biologique. (2) Les relations dose-effet biologique établies pour deux effets différents de l'ocytocine: action natriférique sur la peau et action hydrosmotique (augmentation de la perméabilité osmotique à l'eau) sur la vessie.

MÉTHODES

Les expériences ont été réalisées sur des grenouilles, *Rana esculenta*, provenant de Roumanie. Les animaux sont conservés à 2° et ramenés à la température du laboratoire au moins 48 h avant les expériences.

Le flux net de sodium est mesuré sur la peau isolée par la méthode du courant de court-circuit³; l'appareil utilisé est celui décrit par MOREL, ODIER ET LUCARAIN⁴ qui permet la mesure simultanée du courant de court-circuit traversant 6 fragments de la même préparation, symétriques deux à deux par rapport à l'axe antéropostérieur de l'animal. L'intensité de l'effet natriférique sur la peau est mesurée par la différence ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) entre le courant de court-circuit au maximum de la stimulation et le courant en l'absence d'hormone.

Le flux net d'eau traversant 2 fragments de la même vessie placée entre 2 milieux de pression osmotique différente (Ringer du côté séreux et Ringer dilué de moitié du côté muqueux) est mesuré de façon continue selon la technique proposée par BOURGUET ET JARD⁵. L'intensité de l'effet hydrosmotique de l'ocytocine est mesurée par l'accroissement du flux net d'eau exprimé en $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Les hormones utilisées sont: l'ocytocine de synthèse (Syntocinon, Sandoz) et la noradrénaline (Rhône Poulenc).

Etablissement des relations dose-effet biologique

(1) *Action natriférique.* Après 1 ou 2 h d'équilibration du courant de court-circuit, une même dose d'ocytocine ($3.7\cdot 10^{-9}$ M) est ajoutée sur les 6 voies; les résultats de cette première stimulation ne sont jamais utilisés pour l'établissement de la relation dose-effet.

Dans le cas de l'ocytocine, 2 types d'expériences ont été réalisées. Dans le premier type d'expérience, sur chaque fragment, 3 à 4 concentrations différentes d'hormone sont appliquées dans un ordre aléatoire et séparées par des périodes de rinçage jusqu'à retour au flux de base. Si la réponse initiale est identique sur les 6 fragments, la relation dose-effet biologique est établie en utilisant les résultats obtenus sur les 6 voies de mesure; si la sensibilité des fragments antérieurs et postérieurs est différente, elle est établie sur les couples de voies symétriques dont la réponse initiale est la même. Dans le cas où les réponses à deux doses identiques d'hormone, ajoutées l'une au début et l'autre à la fin de l'expérience, ne sont pas égales, les

résultats de la manipulation sont écartés. Dans le second type d'expérience, les différentes concentrations d'ocytocine sont ajoutées dans un ordre croissant sans retour au flux de base entre chaque stimulation (réponses cumulées). La relation dose-effet biologique est établie indépendamment pour chacune des 6 voies de mesure. Si les valeurs du courant de court-circuit mesurées avant les stimulations cumulées et après rinçage sont très différentes, les résultats sont écartés. Les relations dose-effet obtenues par ces 2 méthodes sont identiques.

Dans le cas de la noradrénaline, sur chaque fragment, 7 à 8 concentrations différentes sont appliquées dans un ordre aléatoire, et séparées par des périodes de rinçage. La relation dose-effet est établie indépendamment pour chacune des 6 voies de mesure.

(2) *Action hydrosmotique.* Les effets de 8 à 10 concentrations différentes d'ocytocine réparties en ordre aléatoire sont mesurés sur chacun des 2 fragments de la vessie. La relation dose-effet biologique est établie indépendamment sur chacune des 2 voies de mesure.

RÉSULTATS

La Fig. 1 présente à titre d'exemple 3 courbes expérimentales. Elle montre (A) que l'intensité de l'effet natriférique de la noradrénaline sur la peau croît avec la concentration d'hormone selon une relation d'allure hyperbolique tendant asymptotiquement vers une valeur maximale.

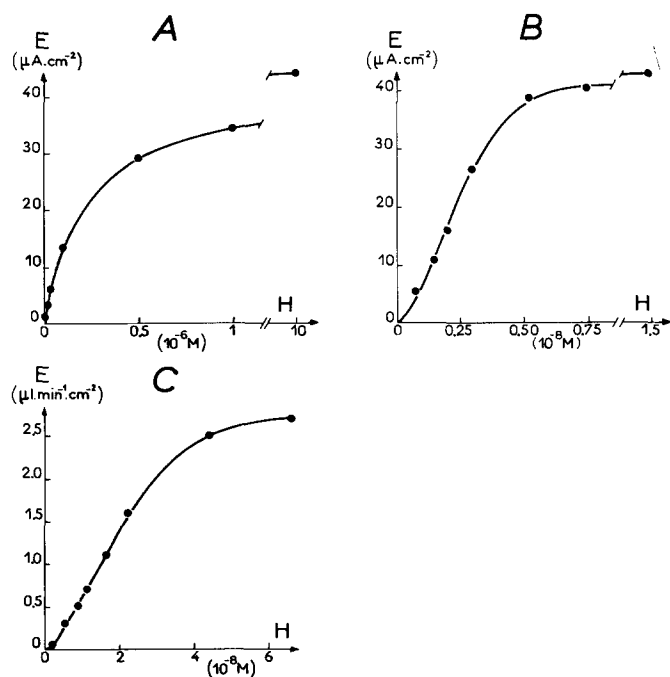


Fig. 1. Représentation directe de 3 exemples de relation dose-effet biologique. A, action natriférique de la noradrénaline sur la peau; B, action natriférique de l'ocytocine sur la peau; C, action hydrosmotique de l'ocytocine sur la vessie. En ordonnées: l'intensité de l'effet biologique (E). En abscisses: la concentration (H) de l'hormone.

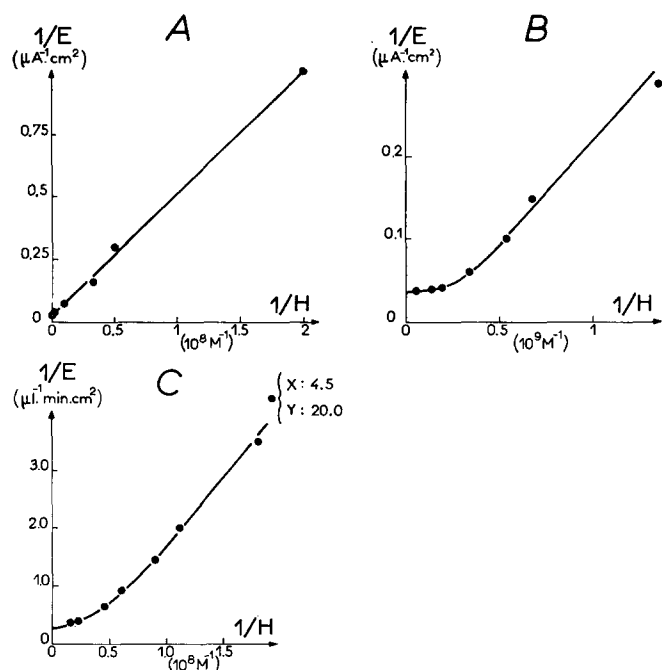


Fig. 2. Représentations en inverse des relations dose-effet présentées dans la Fig. 1. A, B, C, voir Fig. 1. En ordonnées: l'inverse de l'effet biologique. En abscisses: l'inverse de la concentration d'hormone.

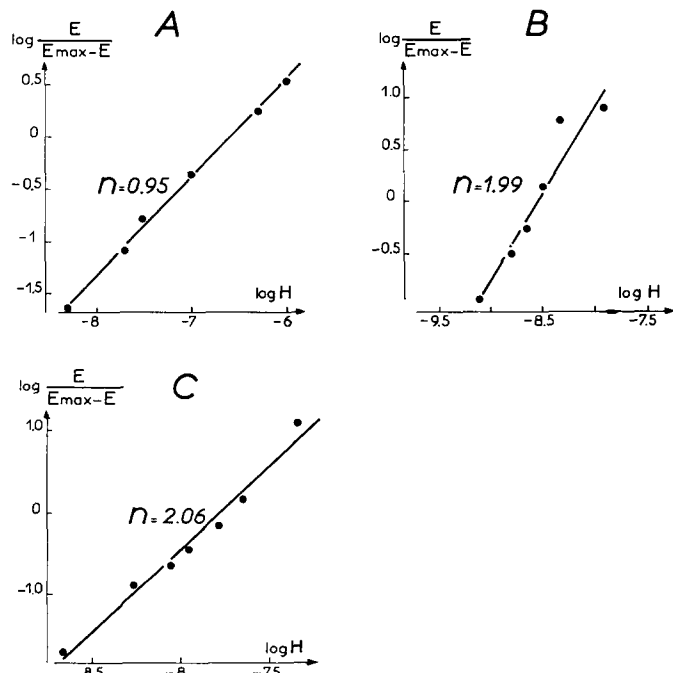


Fig. 3. Représentation de HILL pour les relations dose-effet présentées dans la Fig. 1. A, B, C, voir Fig. 1.

tiquement vers un effet maximum. Au contraire, pour les 2 effets biologiques de l'ocytocine (action natriférique sur la peau (B) et action hydrosmotique sur la vessie (C)), l'allure générale de la courbe est sigmoïde; elle est pratiquement linéaire dans sa partie moyenne; l'effet maximum est atteint rapidement en augmentant la concentration d'hormone.

La nature hyperbolique de la relation dose-effet biologique établie pour la noradrénaline apparaît clairement sur la Fig. 2A. Il existe en effet une corrélation linéaire étroite entre l'inverse de l'effet et l'inverse de la concentration d'hormone. En revanche, ce mode de représentation, appliqué aux relations dose-effet biologique établies pour l'ocytocine tant sur la peau que sur la vessie, fait apparaître une déviation systématique pour les fortes concentrations d'hormone (Figs. 2B et C).

Sur la Fig. 3, les relations dose-effet correspondant aux 3 exemples choisis sont représentées en portant: $\log E/(E_{\max} - E)$ (E : intensité de l'effet biologique; E_{\max} : intensité de l'effet biologique maximum) en fonction de $\log H$ (H : concentration de l'hormone). Ce mode de représentation transforme un arc d'hyperbole en une droite de pente (n) égale à 1. Initialement utilisé par HILL⁶ pour l'étude de la courbe de saturation de l'hémoglobine par l'oxygène et ultérieurement par plusieurs auteurs^{7,8} pour l'étude de la cinétique d'enzymes régulateurs, il permet de transformer les courbes sigmoïdes obtenues en droites de pente supérieure à 1. Ce système de coordonnées fait apparaître une relation linéaire satisfaisante tant pour la noradrénaline que pour l'ocytocine.

Le Tableau I donne les valeurs des pentes des droites de régression linéaire calculées pour l'ensemble des courbes expérimentales. On remarquera que les valeurs obtenues pour la noradrénaline sont toutes très voisines de l'unité; leur moyenne: 1.04 ne diffère pas significativement de 1. Ces résultats montrent que les relations dose-

TABLEAU I

VALEURS DES PENTES DES DROITES OBTENUES DANS LE MODE DE REPRÉSENTATION DE HILL

Les valeurs numériques de n représentent pour l'ensemble des expériences les pentes des droites de régression linéaire entre $\log E/(E_{\max} - E)$ et $\log H$ (coordonnées de HILL). Les valeurs moyennes de n (\bar{n}) sont comparées à 1.

Noradrénaline (action natriférrique sur la peau)			Ocytocine					
			Action natriférrique sur la peau			Action hydrosmotique sur la vessie		
Exp. No.	Nombre de doses	n	Exp. No.	Nombre de doses	n	Exp. No.	Nombre de doses	n
1	5	1.15	8	12	1.45	15	6	1.22
2	6	1.11	9	6	2.02	16	7	1.48
3*	7	0.95	10	6	1.59	17	7	1.52
4	5	0.97	11*	6	1.99	18*	7	2.06
5	9	1.11	12	7	1.77	19	9	1.44
6	7	1.04	13	5	1.68	20	7	1.28
7	6	0.92	14	6	1.48	21	6	1.60
$\bar{n} = 1.04 \pm 0.09$			$\bar{n} = 1.71 \pm 0.23$			$\bar{n} = 1.50 \pm 0.24$		
$t = 0.370$			$t = 8.210$			$t = 5.572$		
$0.08 > P > 0.7$			$P < 0.001$			$0.005 > P > 0.001$		

* Expériences utilisées pour l'illustration.

effet biologique peuvent être décrites de manière satisfaisante par une hyperbole. Au contraire, pour l'ocytocine, les valeurs obtenues, bien que plus dispersées, sont toutes supérieures à 1; leurs moyennes ($\bar{n} = 1.71$ pour l'action natriférique sur la peau et $\bar{n} = 1.50$ pour l'action hydrosmotique sur la vessie) sont voisines et significativement supérieures à l'unité. De telles valeurs excluent que, dans le cas de l'ocytocine, les relations dose-effet biologique puissent être de nature hyperbolique.

DISCUSSION

Les relations dose-effet biologique pour l'action des hormones neurohypophysaires ont été étudiées sur plusieurs récepteurs. Pour l'action antidiurétique de la vasopressine chez le rat, et l'action de la vasotocine sur le rein de la grenouille, HOLLANDER *et al.*⁹ d'une part, JARD¹⁰ d'autre part, observent que la relation dose-effet biologique peut être décrite par une relation hyperbolique. Il en est de même pour l'action de la vasopressine sur la perméabilité à l'eau de la vessie de crapaud¹¹. Dans ce travail, nous montrons, au contraire, que la relation établie pour l'action hydrosmotique de l'ocytocine sur la vessie de grenouille est de nature sigmoïde. Il est vraisemblable que l'extension de l'analyse aux régions extrêmes de la courbe dans ce dernier cas permet de rendre compte de la différence entre ces résultats et ceux d'EDELMAN, PETERSEN ET GULYASSY¹¹. Une relation de nature sigmoïde est également obtenue pour l'action natriférique de l'ocytocine, alors que pour l'action de la noradrénaline la relation est hyperbolique.

La similitude des relations dose-effet établies pour deux actions biologiques distinctes de l'ocytocine sur deux structures différentes, la peau et la vessie, montre que les caractéristiques de cette relation ne sont pas liées à la nature de l'action étudiée. La différence entre les relations établies pour un même effet biologique produit par deux hormones différentes, l'ocytocine et la noradrénaline, confirme cette interprétation. L'ocytocine et la noradrénaline agissant vraisemblablement en stimulant la production du même médiateur, le 3',5'-AMP cyclique, il est logique d'admettre que la chaîne des réactions postérieures à la production du 3',5'-AMP cyclique est commune à l'action de ces deux hormones et que, par conséquent, les différences entre les relations dose-effet biologique interviennent à une étape précédant la production du médiateur. Elles pourraient être liées à la nature de l'interaction entre l'hormone et son récepteur.

Si l'on admet que: (1) l'hormone se fixe sur un récepteur spécifique; (2) la concentration de l'hormone au niveau de son récepteur est égale ou directement proportionnelle à sa concentration dans le milieu de Ringer au contact de la préparation; (3) l'intensité de l'effet biologique est directement proportionnelle à la concentration du complexe hormone-récepteur, les relations dose-effet décrivent la cinétique de saturation du récepteur hormonal.

Les relations obtenues pour la noradrénaline sont identiques à une isotherme d'adsorption d'un gaz sur un solide¹² et à la cinétique de saturation par leur substrat des enzymes de type michaelien¹³. Dans ces deux cas les courbes obtenues peuvent être interprétées en admettant une fixation réversible du ligand (molécules de gaz ou molécules du substrat) sur des sites récepteurs indépendants. Un mécanisme identique peut rendre compte des relations dose-effet biologique établies pour l'action de la noradrénaline.

Les relations sigmoïdes obtenues pour l'action de l'ocytocine présentent des analogies avec la cinétique de saturation de l'hémoglobine par l'oxygène ou la cinétique de saturation de l'hémoglobine par l'oxygène ou la cinétique de saturation de divers enzymes régulateurs par leurs ligands (substrat ou effecteur). Elles pourraient être interprétées, comme dans ces deux derniers cas, en admettant l'existence d'interactions entre sites de fixation. Les mécanismes moléculaires invoqués pour rendre compte de ces interactions⁸ dans la molécule d'hémoglobine ou les molécules d'enzymes allostériques pourraient être appliquées au cas du récepteur hormonal.

Toutefois, il convient de remarquer que les hypothèses introduites dans l'interprétation des relations dose-effet biologique sont actuellement difficilement vérifiables. Néanmoins, elles permettent de décrire de façon simple les relations dose-effet observées pour la noradrénaline. Dans le cas de l'ocytocine, l'existence d'une courbe sigmoïde présentant une région moyenne de pente élevée, permettrait, en assurant une variation importante de l'effet pour de faibles variations de concentration, de rendre compte du rôle régulateur efficace de l'hormone.

RÉSUMÉ

Les relations dose-effet biologique ont été analysées pour l'action natriférique (stimulation du transport actif de sodium) de l'ocytocine et de la noradrénaline sur la peau isolée de la grenouille *Rana esculenta* et pour l'action hydrosmotique (augmentation de la perméabilité osmotique pour l'eau) de l'ocytocine sur la vessie isolée de la même espèce.

Les courbes expérimentales obtenues sont de nature hyperbolique pour l'action de la noradrénaline alors qu'elles sont de forme sigmoïde pour l'action de l'ocytocine tant sur la peau que sur la vessie.

L'action de l'ocytocine et de la noradrénaline sur la peau résultant vraisemblablement de la stimulation de la production d'un médiateur commun: le 3',5'-AMP cyclique, il est suggéré que les différences observées entre les relations dose-effet biologique pour ces deux hormones sont liées à la nature de leurs interactions avec leurs récepteurs spécifiques.

Les courbes hyperboliques obtenues pour la noradrénaline indiqueraient une fixation réversible de l'hormone en des sites indépendants; les courbes sigmoïdes obtenues pour l'ocytocine traduiraient au contraire, l'existence d'interactions entre ses sites récepteurs.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 F. BASTIDE ET S. JARD, *Biochim. Biophys. Acta*, 150 (1968) 113.
- 2 J. ORLOFF ET J. S. HANDLER, *Am. J. Med.*, 36 (1964) 686.
- 3 H. H. USSING ET K. ZERAHN, *Acta Physiol. Scand.*, 23 (1951) 110.
- 4 F. MOREL, M. ODIER ET C. LUCARAIN, *J. Physiol. (Paris)*, 53 (1961) 186.
- 5 J. BOURGUET ET S. JARD, *Biochim. Biophys. Acta*, 88 (1964) 442.
- 6 A. V. HILL, *J. Physiol.*, 40 (1910).
- 7 J. P. CHANGEUX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1965) 267.
- 8 J. MONOD, J. WYMAN ET J. P. CHANGEUX, *J. Mol. Biol.*, 12 (1965) 88.
- 9 W. HOLLANDER, JR., T. F. WILLIAMS, C. C. FORDHAM, III ET L. G. WELT, *J. Clin. Invest.*, 36 (1957) 1059.
- 10 S. JARD, *J. Physiol.*, Suppl. 16, 58 (1966) 123 P.
- 11 I. S. EDELMAN, M. J. PETERSEN ET P. F. GULYASSY, *J. Clin. Invest.*, 43 (1964) 2185.
- 12 I. LANGMUIR, *J. Am. Chem. Soc.*, 38 (1916) 2221.
- 13 L. MICHAELIS ET M. L. MENTEN, *Biochem. Z.*, 49 (1913) 333.