



**Ce travail a été réalisé à Saclay**  
**dans le Service de Biologie Cellulaire**  
**du Département de Biologie**  
**Institut de Recherche Fondamentale**  
**Commissariat à l'Énergie Atomique**

A l'Âme de mon Père,  
A toute ma famille,  
A mes amis

je dédie ce modeste travail.

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude :*

- *A Monsieur le Professeur J.P. GELOSO pour avoir accepté de juger cette thèse.*
  
- *A Monsieur C. de ROUFFIGNAC qui m'a enseigné et sans qui cette étude n'aurait pas été conçue.*
  
- *A Monsieur J.M. ELALOUF, pour son étroite et fructueuse collaboration et pour son aide efficace dans la rédaction de ce mémoire.*

Mes remerciements vont également à toute l'équipe du laboratoire pour sa compétence technique, son soutien et son aide efficace durant toute la durée de l'élaboration de ce travail.

## TABLE DES MATIERES

### GLOSSAIRE

INTRODUCTION .....	1
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	5
I - Modèle expérimental : le rat anhormonal .....	6
II - Préparation des animaux .....	7
III - Déroulement d'une expérience .....	8
III.1 - Expériences de clairance .....	8
III.2 - Expériences de microponctions .....	9
IV - Traitement des échantillons .....	10
IV.1 - Mesure des débits urinaires et tubulaires .....	10
IV.2 - Mesure de la pression osmotique .....	10
IV.3 - Mesure de la radioactivité .....	11
IV.4 - Dosages des électrolytes .....	11
IV.5 - Ultrafiltration des plasmas .....	11
V - Calculs, expression des résultats et analyse statistique ..	12
<u>CHAPITRE I</u> - ATTÉNUATION DE L'EFFET DE LA VASOPRESSINE SUR L'EXCRÉTION URINAIRE DU Mg CONSÉCUTIVE À L'ADMINISTRATION DES DOSES PHARMACOLOGI- QUES DE DDAVP .....	14
I - Introduction .....	15
II - Protocole expérimental .....	15

II.1 - Effet de l'administration aiguë par voie intra-veineuse d'une dose pharmacologique de vasopressine .....	15
II.2 - Effet de l'administration préalable de dDAVP (1 µg/jour.100 g) sur la réponse rénale à la vasopressine, au glucagon et à la calcitonine .....	18
II.2.1 - Influence de l'administration préalable de dDAVP sur la réponse rénale de l'AVP .....	19
II.2.2 - Effet du glucagon chez les animaux préalablement traités par la dDAVP .....	21
II.2.3 - Comparaison des effets du glucagon, de la calcitonine et de l'AVP sur l'excrétion du Mg .....	21
III - Résultats .....	22
III.1 - Influence de l'administration préalable d'une dose pharmacologique de dDAVP sur la réponse rénale à l'AVP .....	22
III.2 - Effets du glucagon chez les animaux préalablement traités par la dDAVP .....	25
III.3 - Comparaison des effets de l'AVP, du glucagon et de la calcitonine .....	28
IV - Discussion .....	33
<u>CHAPITRE II</u> - MISE EN ÉVIDENCE PAR MICROPONCTION D'UNE DÉSENSIBILISATION DE L'ANSE DE HENLE À LA VASOPRESSINE .....	35
- Introduction .....	36
I - Protocole expérimental .....	36
I.1 - Déroulement d'une expérience .....	37
I.2 - Traitement des échantillons .....	38

II - Résultats .....	39
II.1 - Fonction rénale globale .....	39
II.2 - Tubule contourné proximal .....	43
II.3 - Anse de Henle .....	47
III - Discussion .....	57
III.1 - Effet de la vasopressine chez l'animal anormal .....	57
III.2 - Effet du glucagon chez l'animal anormal .....	59
III.3 - Effets de la vasopressine et du glucagon chez les rats préalablement traités par la dDAVP .....	61
<u>CHAPITRE III - RÉVERSIBILITÉ DE LA DÉSENSIBILISATION</u> INDUITE PAR LA DDAVP .....	65
- Introduction .....	66
I - Méthodes .....	67
II - Résultats .....	69
III - Discussion .....	74
CONCLUSION .....	79
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	83

## INTRODUCTION

---

Depuis 1975, il est établi qu'outre le canal collecteur, d'autres segments du néphron de mammifères sont des sites d'action de la vasopressine / 39 /. Le segment grêle et le segment large ascendant de l'anse de Henle, ainsi que le tubule distal, possèdent en effet une adényl-cyclase sensible à la vasopressine, chez le rat comme chez le lapin / 39, 40, 53 /.

Le fait que l'adénosine 3'-5' monophosphate cyclique (AMPC) soit le second messenger de l'action hormonale responsable de l'augmentation de la perméabilité à l'eau dans le canal collecteur, est connu depuis 1966 / 27 /. Récemment, des études physiologiques effectuées *in vivo* et *in vitro* ont permis de connaître les effets physiologiques de la vasopressine sur le segment large ascendant de l'anse de Henle et d'établir, là encore, que l'AMPC est bien le second messenger de l'action hormonale. Plusieurs équipes ont ainsi pu montrer *in vitro* par la technique de microperfusion de tubules isolés que la vasopressine et le dibutyryl AMPC augmentent la réabsorption de NaCl dans le segment large ascendant médullaire du néphron de rat / 67, 80 / et de souris / 32, 36, 67 /.

Par ailleurs, Morel et coll. ont observé que plusieurs hormones peptidiques augmentent l'activité adényl-cyclasique dans le segment large ascendant, le tubule distal et le canal collecteur. Ainsi, chez le rat, la vasopressine, le glucagon et la calcitonine stimulent l'adényl-cyclase du segment large ascendant médullaire ; dans le segment large ascendant cortical, outre ces trois hormones, l'adényl-cyclase est également activée par l'hormone parathyroïdienne (PTH) et, à un moindre degré, par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques / 51 /. Les mesures d'activité adényl-cyclasiques / 50 / ou d'accumulation intracellulaire d'AMPC dans des cellules tubulaires intactes / 75 /, ont permis de conclure que la vasopressine, le glucagon, la calcitonine et la PTH ont des effets non additifs sur l'adényl-cyclase du segment large ascendant. Cette non additivité indique que dans un segment tubulaire donné, toutes les hormones actives doivent agir sur les mêmes

cellules. La nature de la réponse à une stimulation hormonale dépendant non de l'hormone elle-même mais des caractéristiques fonctionnelles des cellules où la production d'AMPc est accrue, il a été proposé que plusieurs hormones pourraient exercer les mêmes effets physiologiques dans le segment large ascendant de l'anse de Henle / 51, 75 /.

L'hypothèse de la similitude des effets de la vasopressine, du glucagon, de la calcitonine et de la PTH sur le segment large ascendant, a pu être démontrée *in vivo* en utilisant un modèle expérimental original permettant d'étudier les effets de chacune de ces hormones en l'absence des trois autres susceptibles par leur présence de masquer la réponse recherchée / 4, 22, 62 /. Ces études ont établi que les quatre hormones stimulent la réabsorption du K, Mg et Ca dans l'anse de Henle, et que trois d'entre elles au moins (la vasopressine, le glucagon et la calcitonine) stimulent également la réabsorption de NaCl. Il a été proposé que l'absence d'effets significatifs de la PTH sur ce dernier paramètre est due au fait que cette hormone n'agit que dans la partie corticale du segment large ascendant / 2, 64 /.

Nous nous sommes proposés ici d'étudier les phénomènes de désensibilisation à la vasopressine de ses deux segments cibles principaux, le canal collecteur et la branche large ascendante. On sait, en effet, que, pour un grand nombre d'hormones peptidiques, une augmentation aiguë ou prolongée de la concentration d'hormone circulante peut induire une diminution de la réponse biologique des cellules cibles. Cette désensibilisation est qualifiée d'homologue (ou spécifique) si l'atténuation de la réponse est observée seulement pour l'hormone responsable de la diminution de la réponse cellulaire. Une désensibilisation est dite hétérologue (ou non spécifique) si la réponse biologique à d'autres hormones est également altérée / 7, 13, 43, 71 /.

L'objectif de notre travail était d'établir la nature de la désensibilisation (homologue ou hétérologue) induite par la vasopressine dans le segment large ascendant, et de déterminer si le canal collecteur et le segment large ascendant peuvent être désensibilisés de façon indépendante. Il nous a fallu, dans un premier temps, établir un protocole

expérimental permettant d'étudier *in vivo* les phénomènes de désensibilisation à la vasopressine. Le chapitre I est consacré à la description du modèle animal étudié.

La technique des microponctions, désormais classique, permet de localiser *in situ* les segments responsables de la modification de l'excrétion urinaire des solutés. Cette technique a été utilisée pour confirmer la désensibilisation du segment large ascendant. L'étude par microponctions des mouvements d'eau et d'électrolytes le long du néphron chez l'animal désensibilisé à la vasopressine est l'objet du chapitre II. Enfin, nous nous sommes attachés à vérifier la réversibilité du phénomène étudié. Ce travail est l'objet du dernier chapitre.

MATERIEL ET METHODES

## I - MODÈLE EXPÉRIMENTAL : LE RAT ANHORMONAL

L'utilisation de rats ayant une concentration plasmatique réduite de vasopressine, glucagon, calcitonine et PTH endogènes pour étudier les effets sur la branche large ascendante ou le canal collecteur de chacune de ces quatre hormones, a fait l'objet de nombreuses publications / 2, 4, 5, 17-24, 62-65 /.

Ce modèle repose sur l'utilisation du rat Brattleboro / 77 /. Cette souche est caractérisée par un diabète insipide (DI) héréditaire permanent dû à un déficit de production de vasopressine. Les récepteurs rénaux de l'hormone sont cependant présents, et l'administration aiguë ou prolongée d'ADH induit l'élaboration d'une urine hypertonique / 76, 77 /. La thyroparathyroïdectomie aiguë permet de réduire la concentration de calcitonine et de PTH endogènes, et l'administration de somatostatine par voie intra-veineuse durant l'expérience permet d'abaisser la glucagonémie à des valeurs inférieures à  $7 \times 10^{-12}$  M / 4 /.

Les principales caractéristiques de la fonction rénale de ces animaux, dit "anhormonaux", ont été décrites précédemment / 22, 62, 64 /. Rappelons simplement qu'ils excrètent un volume abondant ( $\sim 10$  % du filtrat glomérulaire) d'urine hypotonique du fait de l'absence de vasopressine. L'excrétion de phosphate est fortement abaissée (0-3 % de la charge filtrée), un effet secondaire à l'absence de PTH. Enfin, l'excrétion du magnésium et celle du calcium sont singulièrement élevées, atteignant 20-30 % et 5-10 % de la charge filtrée, respectivement. Ces valeurs élevées de l'excrétion du magnésium et du calcium (chez le rat normal, l'excrétion fractionnaire du magnésium atteint 10 % environ / 56a/, et celle du calcium est inférieure à 1 % / 1a /) sont attribuables non à l'absence d'une hormone en particulier, mais à la suppression simultanée de la vasopressine, de la calcitonine, du glucagon et de la PTH. Ces quatre hormones sont en effet toutes capables d'augmenter la

réabsorption rénale du magnésium et du calcium / 4, 5, 22, 62 /. Enfin, notons que la filtration glomérulaire est légèrement inférieure à 1 ml/min.g de rein, valeur la plus fréquemment mesurée chez le rat, y compris chez le rat Brattleboro / 62 /. Cette légère diminution de la filtration glomérulaire n'est cependant pas toujours significative / 22, 62 /.

## II - PRÉPARATION DES ANIMAUX

Les animaux sont élevés à l'animalerie du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay. Ils ont un poids corporel compris entre 150 et 200 g, et sont âgés de 8 à 12 semaines. Une semaine avant l'expérience l'eau de boisson des animaux est remplacée par de l'eau distillée afin d'éviter un apport éventuellement variable en électrolytes, notamment en calcium, par l'eau de la ville.

Dix huit heures avant l'expérience, les rats sont mis à jeun et placés en cage à métabolisme afin de vérifier qu'il s'agit de rats homozygotes, la pression osmotique des urines devant être inférieure à 250 mOsmol/Kg H<sub>2</sub>O / 77 /.

Les animaux sont anesthésiés au moyen d'une injection intrapéritonéale de 10 mg/Kg d'inactine (ByK, ByK-Gulden-Konstanz, RFA) et sont, dès l'obtention de l'anesthésie, placés sur une table chauffante thermostatée permettant de maintenir la température corporelle à 37°C. Une ablation chirurgicale des glandes thyroïdes et parathyroïdes est alors réalisée. Une trachéotomie est ensuite effectuée. Pour la perfusion des solutions, des cathéters (PE 50) sont introduits dans la veine jugulaire droite et la veine fémorale droite. Un autre cathéter PE 50 rempli d'une solution de NaCl à 9 g/l héparinée est introduit dans l'artère fémorale droite, afin de pouvoir mesurer la pression artérielle et d'effectuer des prélèvements sanguins. Enfin, après l'ouverture de l'abdomen selon une incision longitudinale médiane, des cathéters PE 50 sont introduits dans les uretères droit et gauche pour le recueil de l'urine définitive.

Afin de compenser les pertes liquidiennes liées à l'intervention chirurgicale, 4 ml d'une solution de NaCl à 9 g/l sont administrés en 4 fois durant la préparation. A la fin de l'intervention une compresse imbibée de NaCl à 9 g/l est placée sur l'ouverture abdominale. Lorsque des microponctions sont effectuées, le rein gauche est exposé selon la méthode décrite par Gottschalk et Mylle / 26 /. A cet effet, après laparotomie longitudinale médiane, une incision sous costale gauche est réalisée avec un thermo-cauthère. Les viscères sont positionnées dans la partie droite de l'abdomen.

Le champ opératoire, à l'exception du rein gauche, est recouvert de compresses imbibées d'une solution de NaCl à 9 g/l préchauffée à 37°C. Un écarteur métallique, solidaire de la table d'opération, est ensuite interposé entre le rein et le diaphragme, afin d'éviter la transmission au rein des mouvements respiratoires. Un anneau de plexiglas est ensuite amené au contact du rein. Cet anneau a un double rôle : d'une part, il permet d'atténuer les mouvements du rein dus au pouls artériel ; d'autre part, il délimite le champ opératoire dans lequel les microponctions sont effectuées. Un guide de lumière souple relié à un arc au xénon assure l'éclairage de cette surface.

### III - DÉROULEMENT D'UNE EXPÉRIENCE

#### III.1 - Expériences de clairance

A partir du temps zéro de l'expérience, les animaux reçoivent par la veine jugulaire droite une solution de NaCl perfusée à un débit constant de 20  $\mu$ l/min et contenant 1 mg/ml de sérum albumine de boeuf (fraction V, Sigma, USA), 50  $\mu$ Ci d'inuline tritiée (New England Nuclear) comme indicateur glomérulaire et 7  $\mu$ g/ml de somatostatine (Clin, Midy, CH 9357, France). La somatostatine est ainsi perfusée à un débit de 140 ng/min. Lorsqu'une des hormones étudiée doit être administrée, elle est ajoutée à cette solution. La solution administrée est une solution de NaCl à 4 g/l pour les animaux diurétiques. Les animaux non diurétiques

(c'est-à-dire ceux auxquels de l'AVP est administrée pendant l'expérience) reçoivent quant à eux une solution de NaCl à 9 g/l.

Chez les animaux diurétiques, une solution de NaCl à 4 g/l est également perfusée par la veine fémorale droite à un débit de 84  $\mu$ l/min afin de compenser les pertes urinaires. Ce débit est ajusté chaque fois qu'il est nécessaire tout au long de l'expérience, après chaque détermination du débit urinaire. La somatostatine et l'inuline sont administrées durant une période d'équilibration d'une heure, précédant la mesure des clairances.

Les expériences comportent cinq périodes de clairance, la première de celles-ci commençant environ 3 heures après la thyroparathyroïdectomie. La durée de chacune des périodes est de 30 minutes. Cinq prélèvements sanguins sont effectués, au milieu de chacune de ces périodes.

Après chaque prélèvement sanguin, l'échantillon est centrifugé et le plasma est conservé sous huile. Les globules rouges sont remis en suspension dans du NaCl à 9 g/l et réinjectés par la veine fémorale. Ce procédé permet de maintenir la pression artérielle à sa valeur initiale. A la fin de l'expérience le rein gauche est prélevé et pesé après dissection de la graisse périrénale.

### III.2 - Expériences de microponctions

Le protocole est similaire à celui qui a été décrit précédemment, excepté les prises de sang qui sont effectuées au début et à la fin de chaque période de clairance.

Les expériences comportent trois à cinq périodes de clairance durant lesquelles les microponctions sont effectuées. Des petites quantités (1 à 2 nl) de vert de lissamine sont injectées dans la lumière des tubules proximaux à l'aide de micropipettes de verre montées sur micro-manipulateur (Leitz, RFA). Pour faciliter la pénétration dans les tubules, la pointe de ces pipettes est taillée en biseau. Les parties proximales et distales d'un même néphron sont identifiées en suivant la progression du colorant.

Les microponctions sont effectuées à l'aide de micropipettes de diamètre externe à la pointe de 6 à 7  $\mu\text{m}$ , remplies d'huile de ricin colorée avec du noir soudan.

Les tubules proximaux terminaux et distaux précoces du même néphron sont ponctionnés en commençant par le site le plus distal. La totalité du fluide qui s'écoule au point de la ponction est prélevée. Les microponctions durent de 1 à 6 minutes, selon le débit tubulaire. A la fin du prélèvement, la pipette est remplie d'huile de vaseline, et placée dans un bécher contenant de l'huile saturée d'eau jusqu'au moment du traitement de l'échantillon.

#### IV - TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

##### IV.1 - Mesure du débit urinaire

Le débit urinaire ( $\dot{V}$ ) est déterminé par pesée en assimilant la densité de l'urine à celle de l'eau. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{l}/\text{mn}$ .

Les débits tubulaires ( $\dot{V}$ ) sont déterminés en divisant le volume de fluide prélevé (mesuré à l'aide d'une micropipette calibrée) par la durée de la microponction. Les résultats sont exprimés en nanolitres par minute ( $\text{nl}/\text{mn}$ ).

##### IV.2 - Mesure de la pression osmotique

La pression osmotique des échantillons de plasma et d'urine est mesurée au moyen d'un osmomètre à pression de vapeur (Wescor, Inc.). Les résultats sont exprimés en  $\text{mOsm}/\text{Kg H}_2\text{O}$ .

La pression osmotique des micro-échantillons tubulaires est déterminée par cryométrie / 57 /.

#### IV.3 - Mesure de la radioactivité

La radioactivité contenue dans les échantillons de plasma et d'urine est mesurée grâce à un spectromètre à scintillation liquide (Intertechnique SL 4000). Des volumes connus de 5  $\mu$ l d'échantillon sont déposés sur le bord d'une fiole de comptage dans une gouttelette d'eau de 30  $\mu$ l. Trois ml de mélange scintillant (Pico Fluor) sont ensuite ajoutés. Chaque échantillon est compté deux fois durant 10 à 20 minutes.

En ce qui concerne la radioactivité des échantillons de fluide tubulaire, 5 à 10 nl sont prélevés sous contrôle binoculaire avec une micropipette calibrée et déposés, comme les échantillons de plasma et d'urine, dans une gouttelette d'eau reposant sur le bord d'une fiole de comptage. Chaque échantillon est ensuite compté au moins deux fois pendant un temps suffisamment long pour obtenir plus de 500 impulsions au-dessus du bruit de fond.

#### IV.4 - Dosage des électrolytes

La concentration en phosphate des échantillons de plasma et d'urines est déterminée par une méthode colorimétrique / 14 /, celle du Mg, Ca, K, Na au moyen d'un spectromètre à fluorescence atomique (BAIRD, USA). Les résultats sont exprimés en mmol/l.

Les concentrations en Na, Cl, K, Pi, Mg et Ca des échantillons d'ultrafiltrat plasmatique et de fluide tubulaire sont déterminés à l'aide d'un microanalyseur à sonde électronique de Castaing (Cameca, Camebax, France) selon la technique de Morel et Roinel / 52 /.

#### IV.5 - Ultrafiltration des plasmas

La composition de l'ultrafiltrat glomérulaire est estimée en analysant un ultrafiltrat artificiel obtenu par ultrafiltration du plasma à travers une membrane de cuprophane / 44 /. Deux microlitres de chaque échantillon plasmatique sont ainsi ultrafiltrés.

## VI - CALCULS, EXPRESSION DES RÉSULTATS ET ANALYSE STATISTIQUE

### VI.1 - Filtration glomérulaire (FG)

Elle est déterminée par la clairance de l'inuline tritiée :

$$FG = (U/P)_{in} \times \dot{V}$$

$\dot{V}$  est le débit urinaire, exprimé en  $\mu\text{l} \cdot \text{mn}^{-1}$   $(U/P)_{in}$  est le rapport de la radioactivité urinaire et plasmatique. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{l}/\text{mn}$ .

Par analogie, la filtration glomérulaire individuelle des néphrons ponctionnés est calculée selon :

$$fg = (F/P)_{in} \times \dot{V}$$

$(F)_{in}$  = concentration de l'inuline dans le fluide tubulaire prélevé dans une partie du néphron ;  $P_{in}$  = concentration de l'inuline dans le plasma au même moment ;  $V$  = débit de collection du fluide tubulaire, en  $\text{nl} \cdot \text{mn}^{-1}$ .

Pour chaque élément, les quantités excrétées dans l'urine ou délivrées au point de ponction sont calculées en faisant le produit du débit urinaire (ou tubulaire) et de la concentration urinaire (ou tubulaire) de cet élément.

### VI.2 - Excrétion fractionnaire (EF %)

Pour un élément (e) donné, EF % représente le pourcentage de la quantité filtrée qui est excrété dans l'urine.

L'excrétion fractionnaire est calculée selon la formule suivante :

$$EF \% (e) = (U/UF)_e / (U/P)_{in}$$

UF représente ici la concentration de l'élément considéré dans l'ultra-filtrat plasmatique.

L'excrétion fractionnaire de l'eau est équivalente à l'inverse de  $(U/P)_{in}$  :

$$EF \% H_2O = 1/(U/P)_{in}$$

### VI.3 - Quantité filtrée (QF)

Pour chaque néphron, les quantités filtrées sont calculées selon la formule :

$$QF = fg \times (UF)_e$$

où  $(UF)_e$  est la concentration de l'élément (e) dans l'ultrafiltrat plasmatique. Les résultats sont exprimés en picomoles par minute ( $pmol.mn^{-1}$ ).

### VI.4 - Quantité délivrée (QD)

La quantité délivrée en un point donné du néphron (QD) est calculée au moyen de la formule suivante :

$$QD = F(e) \times fg / (F/P)_{in}$$

où  $F(e)$  est la concentration tubulaire de l'élément (e). Les résultats sont exprimés en picomole par minute ( $pmol.mn^{-1}$ ).

### VI.5 - Débit fractionnaire (DF %)

Le débit fractionnaire d'un élément (e) représente le pourcentage de la quantité filtrée encore présent au point de ponction. Il a été calculé à partir de l'expression :

$$DF \% = (F/P)_e / (F/P)_{in} \times 100$$

### VI.6 - Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats est réalisée en effectuant une analyse de variance. Lorsque la valeur F le permet, un test dit de "t" modifié est appliqué / 69 /. Une différence est considérée comme significative pour une valeur de  $P < 0,05$ . Les moyennes sont données avec leur erreur standard (ES).

CHAPITRE I

ATTENUATION DE L'EFFET DE LA VASOPRESSINE SUR  
L'EXCRETION URINAIRE DU  $Mg$  CONSECUTIVE A  
L'ADMINISTRATION DE DOSES PHARMACOLOGIQUES DE  $dDAVP$

## I - INTRODUCTION

La vasopressine, comme nous l'avons déjà indiqué, stimule la réabsorption du Cl, Na, Mg, Ca et K dans la branche large ascendante du néphron de rat / 23, 62, 80 /. Cet effet est directement responsable de la réduction de l'excrétion urinaire du Mg / 23, 62 /. Le glucagon, la calcitonine et le PTH diminuent également l'excrétion du Mg. Comme pour l'AVP, cette action résulte, dans une large mesure, d'une stimulation de la réabsorption du Mg dans l'anse de Henle / 4, 5, 22, 23 /. Pour déceler une désensibilisation éventuelle de la branche large ascendante à la vasopressine, nous avons donc choisi, dans un premier temps, de mesurer l'excrétion urinaire du Mg après l'administration de doses pharmacologiques de vasopressine ou de 1-deamino-8-D-arginine-vasopressine (dDAVP), un analogue synthétique dont l'activité vasoconstrictrice est fortement réduite / 11, 78 /. Parallèlement, nous avons également mesuré la pression osmotique et le débit urinaire, afin d'évaluer la réponse du canal collecteur.

## II - PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

### II.1 - Effet de l'administration aiguë par voie intraveineuse d'une dose pharmacologique de vasopressine

Les travaux sur la régulation des récepteurs et de l'adényl-cyclase, effectués sur des cultures cellulaires / 16, 60, 72 / ou des membranes préparées à partir d'homogénats tissulaires / 9, 47, 55, 58 /, ont montré qu'une désensibilisation aux hormones peptidiques peut être obtenue dans la demi-heure qui suit l'exposition des cellules cibles à l'hormone. La cinétique de réversibilité du phénomène de désensibilisation varie quant à elle de façon importante, allant de quelques heures / 55, 58 / à plusieurs jours / 38 /, selon les systèmes étudiés. Pour cette raison, nous avons commencé par rechercher une désensibilisation à la vasopressine

en administrant une dose pharmacologique d'hormone 2 heures seulement avant le début de l'expérience. Cette étude s'avérait en effet nécessaire si la réversibilité de la désensibilisation à la vasopressine est de l'ordre de quelques heures. Dans ces expériences, nous avons choisi d'essayer de désensibiliser les animaux en administrant de l'arginine-8-vasopressine (AVP) par voie intraveineuse. L'AVP, qui est l'hormone naturellement présente chez le rat, présente en effet l'avantage d'avoir une demi-vie de 2 à 3 minutes / 11 /. Nous pouvions donc espérer, deux heures après la fin de l'injection, que la concentration circulante ait suffisamment diminué pour qu'une étude physiologique soit possible.

Quinze animaux ont été étudiés. Le premier groupe, constitué de 5 rats anormonaux (A), sert de témoins. Un deuxième groupe de rat anormonaux (n = 5) reçoit une perfusion continue d'AVP dès la fin de l'intervention chirurgicale (rats anormonaux + AVP ou A + AVP). L'AVP est administrée à un débit de 20 pg/mn.100 g, c'est-à-dire à une dose qui induit une réduction maximale de la diurèse et de l'excrétion du Mg / 20 /. Dans ces expériences, les mesures de clairance commencent après une période d'équilibration d'une heure durant laquelle, lorsque cela est nécessaire, l'AVP est administrée.

Le troisième groupe d'animaux est constitué de 5 rats anormonaux ayant reçu 2,5 µg d'AVP par voie intraveineuse. L'hormone est administrée par la veine fémorale droite en 30 à 40 minutes. La période d'équilibration débute une heure après la fin de l'administration de cette dose pharmacologique d'AVP, et les mesures de clairance débutent donc deux heures après cette administration. Comme pour le second groupe, les animaux reçoivent dès le début de la période d'équilibration de l'AVP à un débit constant de 20 pg/min.100 g. Ces animaux, ayant reçu une dose pharmacologique d'AVP par voie intraveineuse, sont qualifiés de rats AI + AVP.

L'administration d'une dose pharmacologique d'AVP aux rats anormonaux (rats AI + AVP) s'accompagne d'une augmentation immédiate de la pression artérielle qui passe de 100 à 160 mmHg environ. Une heure après la fin de l'administration, la pression artérielle a cependant diminuée et atteint 90 mmHg. Durant tout le reste de l'expérience, la

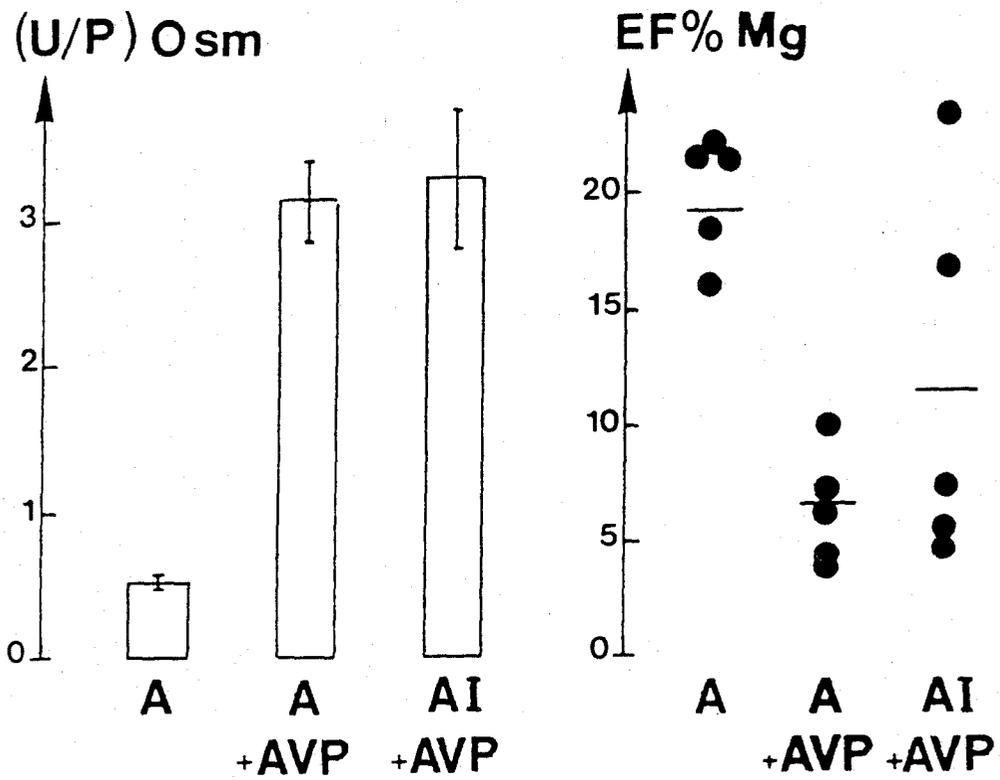


Figure 1 - Effet de la vasopressine (AVP) sur la pression osmotique et l'excrétion fractionnaire urinaire du Magnésium chez les rats ahormonaux (A + AVP) et les rats anhormonaux ayant reçu une dose pharmacologique d'AVP par voie intraveineuse (AI + AVP).

pression artérielle n'est pas significativement différente dans les trois groupes d'animaux étudiés.

La figure 1 indique le pouvoir de concentration du rein ( $U/P_{Osm}$ ) et les valeurs individuelles d'excrétion fractionnaire du Mg. Les rats anhormonaux excrètent une urine hypotonique. Le pouvoir de concentration du rein est nettement augmenté chez les rats A + AVP ( $U/P_{Osm} = 3,2 \pm 0,3$ ). Une valeur non significativement différente est obtenue chez les rats AI + AVP.

Chez les rats anhormonaux témoins, l'excrétion du Mg est élevée ( $19,8 \pm 1,1 \%$ ). Elle est significativement plus faible ( $p \leq 0,01$ ) chez les rats A + AVP. Chez les animaux ayant reçu une dose pharmacologique d'AVP, l'excrétion du Mg varie de façon importante d'une expérience à l'autre. L'effet de l'hormone semble en effet présent chez trois animaux sur cinq seulement. L'absence de reproductibilité des résultats dans ce dernier groupe rend toutefois difficile l'interprétation des données.

En conclusion, ce protocole expérimental est inadéquat pour étudier *in vivo* une désensibilisation à l'AVP. D'une part, l'administration par voie intraveineuse de ce peptide entraîne des variations considérables de la pression artérielle, incompatibles dans certains cas avec la survie des animaux (sur 8 expériences, 5 seulement ont pu être menées à terme). D'autre part, la dispersion des résultats observée chez les rats AI + AVP ne permet pas une étude plus approfondie de la désensibilisation vis-à-vis des paramètres étudiés.

## II.2 - Effet de l'administration préalable de dDAVP (1 $\mu$ g/jour.100 g) sur la réponse rénale à la vasopressine, au glucagon et à la calcitonine

Les expériences précédentes montrant l'impossibilité de l'utilisation de l'AVP pour désensibiliser ses cellules cibles, nous avons choisi d'utiliser la dDAVP qui se lie, comme l'AVP, aux récepteurs des cellules épithéliales couplés à l'adényl-cyclase / 11, 31, 66 /, mais à une activité vasoconstrictive réduite d'un facteur 1000 / 78 /. La dDAVP est administrée,

par voie intramusculaire, en solution saline isotonique à raison de 1 µg/jour.100 g. La durée de ce traitement est de 3 jours.

Au cours du traitement par la dDAVP, la pression osmotique urinaire augmente régulièrement (figure 2). Lorsque le traitement est interrompu, la pression osmotique diminue et devient hypotonique en moins de 3 jours. Ceci indique qu'un délai de 48 heures au moins doit être observé pour que la dDAVP soit éliminée. Sur la base de cette information, nous avons choisi d'effectuer les expériences de clairance 48 heures après la dernière injection de dDAVP. L'excrétion d'une urine hypotonique indique en effet qu'à ce moment la concentration plasmatique de dDAVP doit être extrêmement faible (< 1 pg/ml) / 25 /. Il est ainsi possible, grâce à ce protocole, de contrôler l'activité antidiurétique présente dans le plasma au moment de l'expérience.

#### II.2.1 - Influence de l'administration préalable de dDAVP sur la réponse rénale à l'AVP

Trois groupes d'animaux ont été étudiés. Le premier groupe de rats anormonaux (n = 5) sert de témoins. Le second groupe de rats anormonaux (n = 5) reçoit de l'AVP à un débit de 20 pg/mn.100 g pendant l'expérience (rat A + AVP). Le troisième groupe est constitué d'animaux ayant reçu de la dDAVP pendant 3 jours à raison de 1 µg/j.100 g. Les expériences sont réalisées 48 heures après la dernière injection du peptide pour les raisons indiquées ci-dessus. Comme pour les autres groupes, la thyroparathyroïdectomie est effectuée le jour même de l'expérience. Durant celle-ci, de l'AVP est administrée à un débit constant (20 pg/mn.100 g). Ces animaux sont qualifiés de rats anormonaux désensibilisés + AVP (AD + AVP).

Seules les données concernant le Mg obtenues chez les rats anormonaux témoins et les rats anormonaux + AVP sont présentés dans ce chapitre. Les résultats concernant les autres électrolytes sont présentés dans le chapitre III. Chez les rats anormonaux désensibilisés + AVP (AD + AVP), seules l'excrétion de l'eau et du Mg ont été mesurées pour l'étude présentée dans ce chapitre.

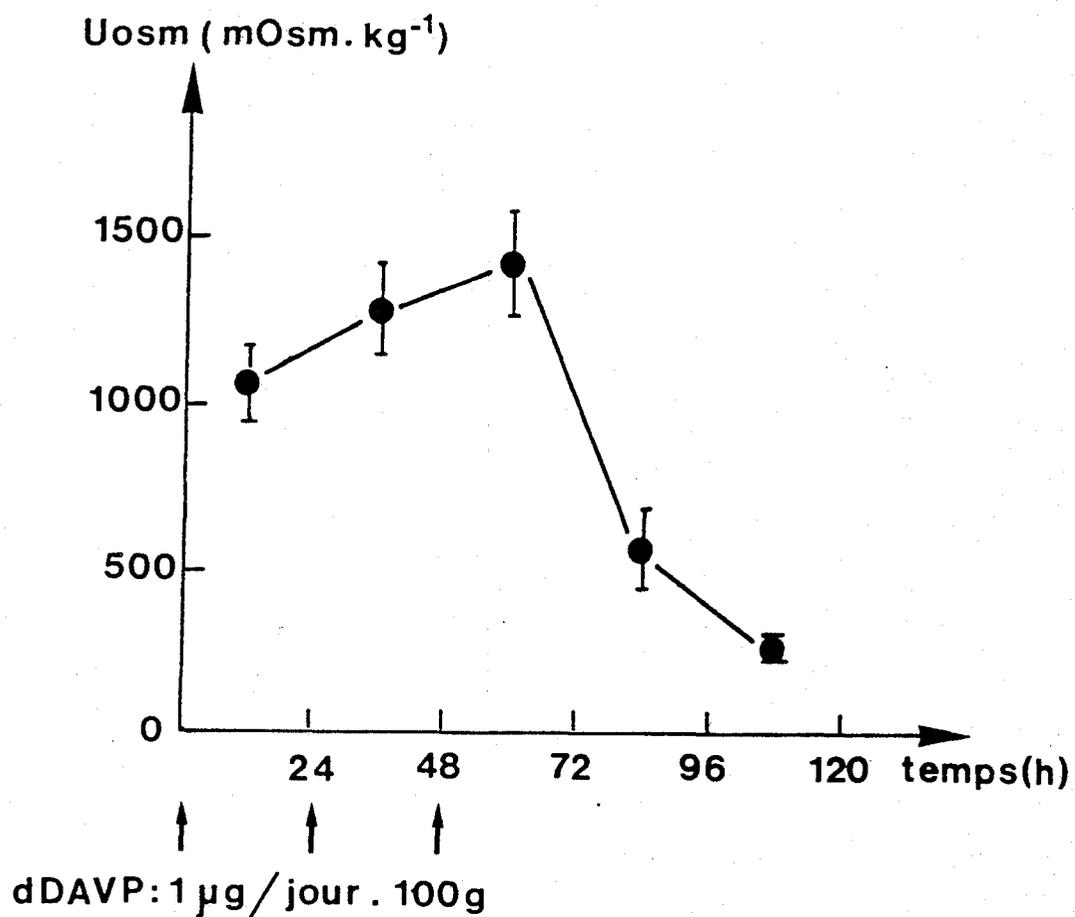


Figure 2 - Evolution de la pression osmotique urinaire ( $U_{osm}$ ) au cours d'un traitement à la dDAVP chez les rats Brattleboro intact.

$U_{osm}$  : pression osmotique exprimée en  $mOsm \cdot Kg^{-1} H_2O$ .

### II.2.2 - Effet du glucagon chez les animaux préalablement traités par la dDAVP

Le glucagon, comme la vasopressine, diminue l'excrétion urinaire du Mg chez le rat anormal / 4, 5, 19 /. Cette série expérimental a été effectuée afin d'étudier les effets du glucagon sur ce paramètre chez les animaux préalablement traités par la dDAVP.

L'étude porte sur 7 animaux. Dès la fin de l'intervention chirurgicale, et pendant toute la durée de l'expérience, de l'AVP est administrée à un débit de 20 pg/min.100 g. Une heure après le début de la perfusion d'hormone, deux périodes de clairance de 30 minutes chacune sont effectuées afin d'évaluer les effets de l'AVP chez ces animaux préalablement traités par la dDAVP. Durant la dernière partie de l'expérience, du glucagon est administré (2,5 ng/min.100 g). Les effets du glucagon sont étudiés au cours de deux périodes de clairance successives, la première de celles-ci commençant 30 minutes après la perfusion de l'hormone.

### II.2.3 - Comparaison des effets du glucagon, de la calcitonine et de l'AVP sur l'excrétion du Mg

Notre but, dans ces expériences, est de vérifier la réponse rénale à la calcitonine. De plus, comme une additivité des effets de l'AVP et du glucagon a été observée précédemment / 19 /, les effets de cette dernière hormone ont de nouveau été étudiés chez les rats traités par le dDAVP, cette fois-ci en l'absence d'AVP.

Dans cette série expérimentale, nous avons comparé les effets du glucagon, de la calcitonine et de l'AVP chez des rats anormaux et des rats anormaux traités préalablement par la dDAVP. L'étude est donc effectuée sur des rats anormaux (A, n = 5), des rats anormaux recevant du glucagon (A + Glucagon, n = 5), de la calcitonine humaine (A + HCT, n = 5) ou de l'AVP (A + AVP, n = 5).

Des rats anormaux désensibilisés (AD, n = 5) et des rats anormaux désensibilisés recevant du glucagon (AD + Glu, n = 5), de la calcitonine (AD + HCT) ou de l'AVP (AD + AVP) ont également été étudiés.

Les rats anormonaux, anormonaux + AVP et les rats anormonaux désensibilisés + AVP, sont ceux dont les résultats sont présentés dans la Section 2.1 de ce chapitre.

Dans ces expériences, le débit de perfusion des hormones est choisi afin d'induire une réponse rénale maximale : glucagon, 2,5 ng/mn.100 g / 19 / ; HCT, 1 mU/mn.100 g / 17 / ; AVP, 20 pg/mn.100 g / 20 /.

Les animaux auxquels la calcitonine est administrée reçoivent une perfusion de calcium ( $\text{CaCl}_2$  50 mM ; 10  $\mu\text{l}/\text{mn}$ ) et de phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM ; 10  $\mu\text{l}/\text{mn}$ ) afin de maintenir la calcémie et la phosphatémie à leur valeur valeur initiale en dépit de l'administration de calcitonine.

### III - RÉSULTATS

#### III.1 - Influence de l'administration préalable d'une dose pharmacologique de dDAVP sur la réponse rénale à l'AVP

Le tableau I indique la composition plasmatique moyenne des rats anormonaux témoins, des rats anormonaux recevant de l'AVP et des rats anormonaux désensibilisés + AVP. On ne note pas de différence significative concernant la calcémie et la magnésémie d'un groupe à l'autre. La phosphatémie est élevée dans chacun des trois groupes d'animaux, du fait de la thyroparathyroïdectomie et de l'administration de somatostatine / 62, 63 /. La phosphatémie est toutefois légèrement plus basse chez les rats AD + AVP que chez ceux des deux autres groupes. Enfin, l'osmolarité plasmatique mesurée chez les rats A + AVP diffère significativement de celle trouvée chez les rats anormonaux témoins et les rats désensibilisés.

Les rats anormonaux excrètent une urine largement hypotonique au plasma (tableau II), indiquant donc l'obtention d'une diurèse aqueuse. En présence d'AVP, l'urine est hypertonique ( $U/P_{\text{Osm}} = 3,24 \pm 0,25$ ) et, corrélativement, le débit urinaire et l'excrétion fractionnaire de l'eau sont fortement abaissés. La filtration glomérulaire ne varie pas significativement.

TABLEAU I - Composition plasmatique des rats anhormonaux (A), des rats anhormonaux recevant de l'AVP (A + AVP) et des rats anhormonaux désensibilisés recevant l'AVP (AD + AVP). Les valeurs sont exprimées en  $\text{mmol.l}^{-1}$  ou  $\text{m Osm.Kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ . Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience.

	P	Mg	Ca	Osm
A (5)	$3,79 \pm 0,13$	$0,52 \pm 0,13$	$1,97 \pm 0,09$	$312 \pm 3$
A + AVP (5)	$3,95 \pm 0,12$	$0,53 \pm 0,01$	$1,97 \pm 0,09$	$302 \pm 5$ *
AD + AVP (5)	$3,21 \pm 0,15$ **	$0,50 \pm 0,01$	$2,09 \pm 0,09$	$317 \pm 2$

\* : différence significative par rapport aux rats anhormonaux.

\*\* : différence significative par rapport aux deux autres groupes.

TABLEAU II - Valeurs moyennes de la filtration glomérulaire (FG), du débit urinaire (V), de l'excrétion fractionnaire de l'eau (EF %), du rapport des osmolalités urinaires et plasmatiques (U/P)<sub>0sm</sub>, et du poids du rein. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience.

	Poids du rein (mg)	GFR ( $\mu\text{l}/\text{mn}$ )	$\text{U/P}_{0\text{sm}}$ ( $\text{m Osm} \cdot \text{Kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ )	V ( $\mu\text{l}/\text{mn}$ )	EF % H <sub>2</sub> O (% charge filtrée)
A (5)	648 ± 32	634 ± 48	0,50 ± 0,02	58,7 ± 3,6	9,40 ± 0,90
A + AVP (5)	687 ± 33	605 ± 41	3,24 ± 0,25 *	4,3 ± 1,1 *	0,68 ± 0,14 *
AD + AVP (5)	770 ± 74	625 ± 71	2,44 ± 0,41 *	10,3 ± 3,3 *	1,61 ± 0,40 *

\* différence significative par rapport aux rats anormaux.

Le tableau II montre également que les rats traités préalablement par la dDAVP excrètent une urine hypertonique. Chez ces animaux, le débit urinaire et l'excrétion fractionnaire de l'eau sont plus faibles que chez les rats anhormonaux témoins. Le pouvoir de concentration urinaire tend à être plus faible que chez les animaux n'ayant pas été traités. La différence toutefois n'est pas significative. La filtration glomérulaire n'est pas différente de celle mesurée dans les deux autres groupes.

L'administration d'AVP à des rats anhormonaux induit une diminution de près d'un facteur 4 de l'excrétion du Mg (figure 3). Pour un même débit d'administration de l'AVP, l'excrétion urinaire du Mg reste significativement plus élevée chez les animaux traités. Une atténuation de l'effet de l'AVP sur l'excrétion du Mg, ou désensibilisation, est donc encore décelable 48 heures après l'administration d'une dose pharmacologique de dDAVP.

### III.2 - Effets du glucagon chez les animaux préalablement traités par la dDAVP

Dans cette série expérimentale, nous avons étudié les effets d'une dose physiologique de glucagon sur la filtration glomérulaire et l'excrétion du Mg. Afin de vérifier que les animaux étaient désensibilisés à la vasopressine, deux périodes de clairance, pendant lesquelles l'AVP seule était administrée, étaient effectuées. Les effets du glucagon étaient ensuite étudiés.

La figure 4 montre que deux heures après le début de l'administration de l'AVP, l'excrétion du Mg était encore très élevée, atteignant  $17,0 \pm 1,0$  % (n=7). La comparaison de ces résultats avec ceux de la figure 3 montre que les animaux étaient effectivement désensibilisés à l'AVP. L'administration du glucagon s'accompagne toutefois d'une diminution rapide et hautement significative de l'excrétion du Mg, indiquant donc la spécificité du phénomène de désensibilisation. Notons en outre que la diminution de l'excrétion du Mg en présence de glucagon est observée en dépit de l'augmentation, attendue / 4, 19, 45 /, de la filtration glomérulaire.

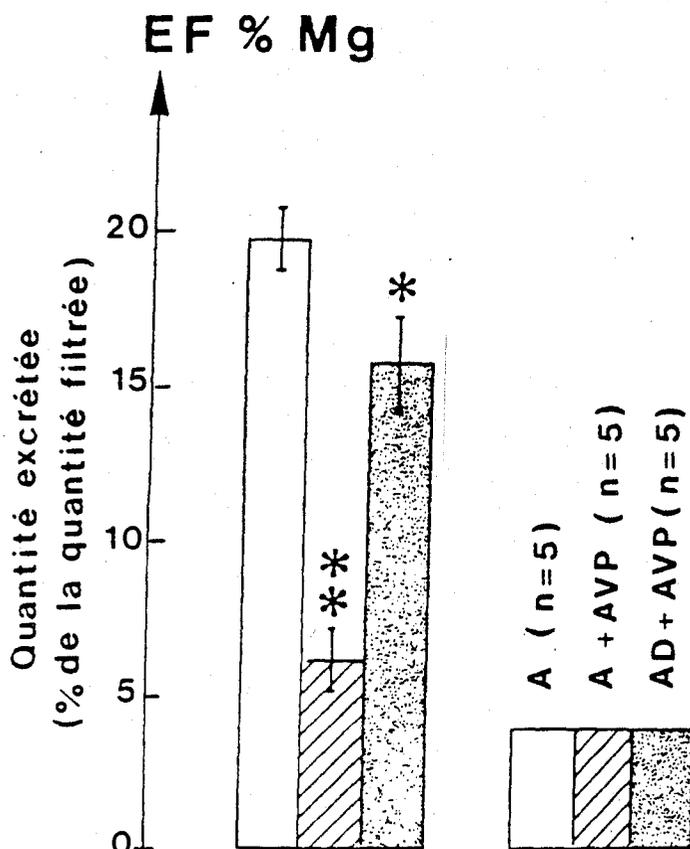


Figure 3 - Valeurs moyennes de l'excrétion fractionnaire du Magnésium (EF % Mg<sup>++</sup>). Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience.

Anhormonal (A) : Anhormonal + AVP à 20 pg.mn<sup>-1</sup>.100 g :,  
 Anhormonal désensibilisé + AVP à 20 pg.mn<sup>-1</sup>.100 g.

\* : P < 0.05 par rapport à l'anhormonal "A".

\*\* : P < 0.01 par rapport aux deux autres groupes.

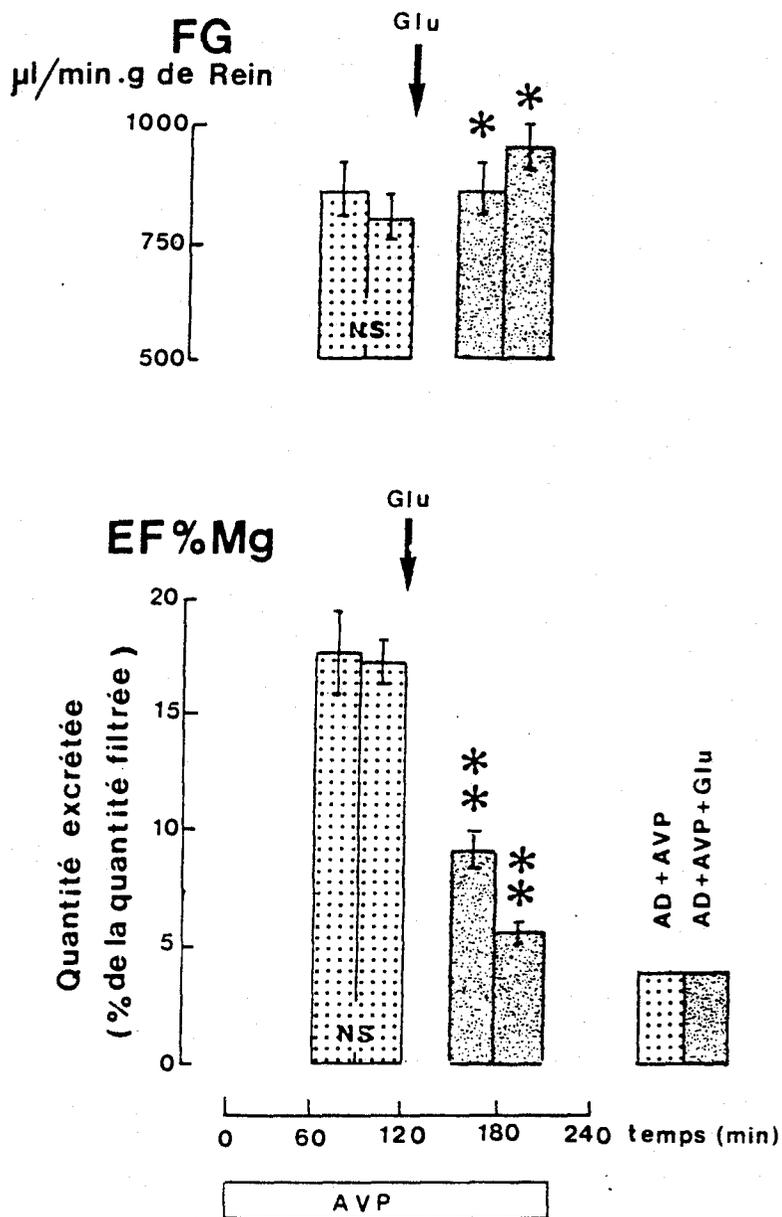


Figure 4 - Effets du glucagon sur la filtration glomérulaire (FG) et sur l'excrétion fractionnaire urinaire du Magnésium (EF %  $\text{Mg}^{++}$ ) chez les rats désensibilisés (AD). L'AVP est donnée à partir du temps zéro de l'expérience et le glucagon deux heures après.

\* :  $P < 0.05$  par rapport à la période expérimentale précédente.

\*\* :  $P < 0.01$  par rapport à la période expérimentale précédente.

NS : non significatif.

### III.3 - Comparaison des effets de l'AVP, du glucagon et de la calcitonine

Dans cette série, les effets de chacune des hormones ont été étudiés chez les rats anormonaux témoins et les rats anormonaux désensibilisés.

Le tableau III rappelle les effets de l'AVP sur l'excrétion de l'eau chez le rat anormal, et indique ceux du glucagon et de la calcitonine. En présence de cette dernière hormone, on note une diminution, déjà observée / 63 /, de l'excrétion de l'eau, sans modification concomitante toutefois de la pression osmotique urinaire. La filtration glomérulaire tend à être plus élevée en présence de glucagon et de calcitonine que chez les rats anormonaux témoins.

Chez les animaux désensibilisés (tableau IV), on ne note la formation d'une urine hypertonique que lorsque de l'AVP est administrée pendant l'expérience. L'excrétion d'une urine hypotonique chez les rats AD, AD + Glu ou AD + HCT confirme l'élimination de la dDAVP administrée préalablement à l'expérience. Dans cette série expérimentale, on note une augmentation, significative cette fois-ci, de la filtration glomérulaire en présence de glucagon et de calcitonine.

Les effets de l'AVP, du glucagon et de la calcitonine sur l'excrétion du Mg chez les rats anormonaux témoins et les animaux désensibilisés sont comparés sur les figures 5 et 6. Chez le rat anormal, chacune des hormones diminue fortement l'excrétion du Mg. L'effet le plus marqué est celui de la calcitonine. Chez les animaux désensibilisés, on note de nouveau une nette diminution de l'excrétion du Mg en présence de glucagon et de calcitonine, et une atténuation très nette de l'effet de l'AVP. La figure 6 montre que chez les animaux désensibilisés par le dDAVP, l'amplitude de l'effet de l'AVP est réduite de près de 60 %. Les effets du glucagon et de la calcitonine ne sont en revanche pas sensiblement affectés.

TABLEAU III - Valeurs moyennes de la filtration glomérulaire (FG), du débit urinaire (V), de l'excrétion fractionnaire de l'eau (EF % H<sub>2</sub>O) et la pression osmotique urinaire. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience.

	FG ( $\mu$ l/mn)	EF % H <sub>2</sub> O (% quantité filtrée)	V ( $\mu$ l/mn)	U <sub>Osm</sub> (m Osm/Kg H <sub>2</sub> O)
A (n=5)	634 $\pm$ 48	9.4 $\pm$ 0.9	59 $\pm$ 4	158 $\pm$ 6
A + AVP (n=5)	605 $\pm$ 41	0.68 $\pm$ 0.14 **	4.3 $\pm$ 1.1 **	975 $\pm$ 74 **
A + Glu (n=5)	719 $\pm$ 34	7.9 $\pm$ 1.1	57 $\pm$ 9	158 $\pm$ 16
A + HCT (n=5)	688 $\pm$ 37	5.5 $\pm$ 0.8 *	39 $\pm$ 6 *	163 $\pm$ 18

\* Différence significative par rapport aux rats ahormonaux : \* P < 0.05 ; \*\* P < 0.001.

TABLEAU IV - Valeurs moyennes de la filtration glomérulaire (FG), de l'excrétion fractionnaire de l'eau, du débit urinaire (V) et de la pression osmotique urinaire ( $U_{Osm}$ ). Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience. AD : rats anormaux désensibilisés, c'est-à-dire traités préalablement par le dDAVP et ne recevant aucune hormone pendant l'expérience.

	FG ( $\mu$ l/mn)	EF % H <sub>2</sub> O (% quantité filtrée)	V ( $\mu$ l/mn)	$U_{Osm}$ (m.Osm/Kg.H <sub>2</sub> O)
AD	471 $\pm$ 38	8,9 $\pm$ 1,5	43 $\pm$ 9	180 $\pm$ 18
AD + AVP	602 $\pm$ 25	1,8 $\pm$ 0,4 *	11 $\pm$ 3 *	720 $\pm$ 140 *
AD + Glu	848 $\pm$ 25 *	10,8 $\pm$ 0,4	91 $\pm$ 5 *	183 $\pm$ 10
AD + HCT	789 $\pm$ 32 *	7,9 $\pm$ 0,5	62 $\pm$ 3 *	163 $\pm$ 13

\* Différence significative par rapport aux rats anormaux désensibilisés (AD).

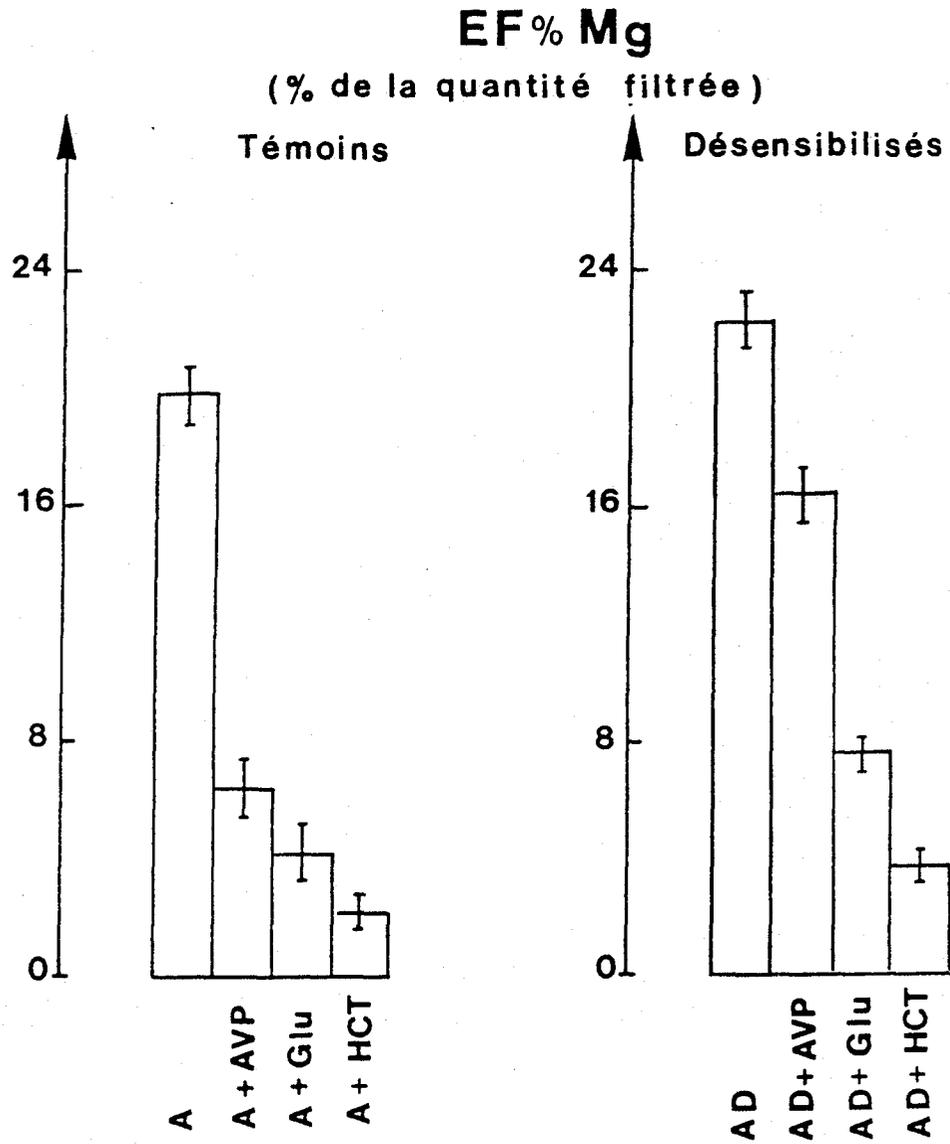


Figure 5 - Valeurs moyennes de l'excrétion fractionnaire du magnésium. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience.

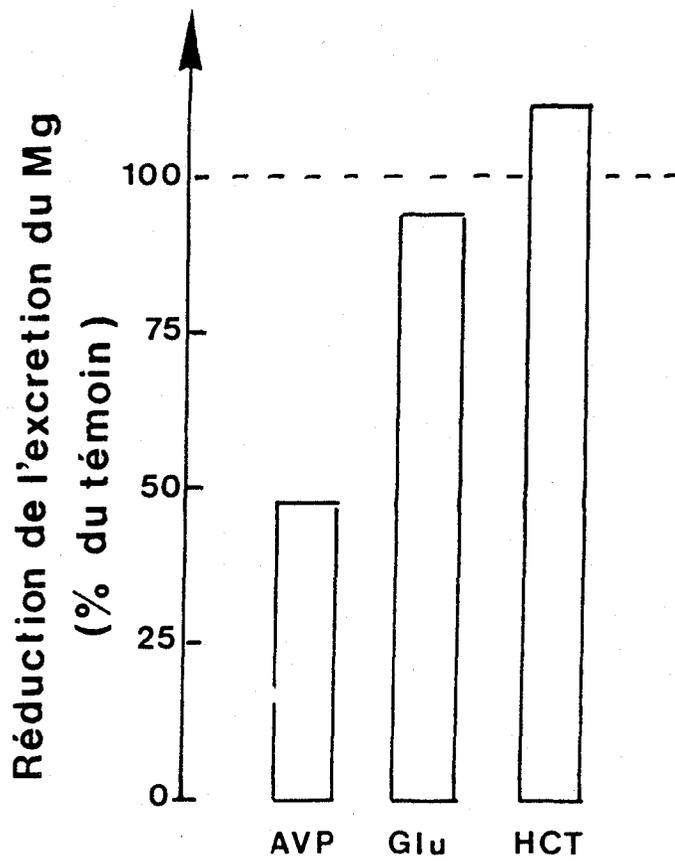


Figure 6 - Comparaison des effets de l'AVP, du glucagon et de la calcitonine sur l'excrétion fractionnaire du Magnésium (EF %)  $Mg^{++}$  chez les rats désensibilisés. Les résultats sont calculés à partir des données de la figure 5. Les effets de chaque hormone chez les animaux désensibilisés sont exprimés en % de ceux observés chez les animaux non traités par la dDAVP.

#### IV - DISCUSSION

Ces expériences montrent que l'administration d'une dose pharmacologique de dDAVP induit une atténuation de l'effet de la vasopressine sur l'excrétion du Mg, cette atténuation persistant 48 heures après la fin de l'administration de dDAVP. Le protocole expérimental retenu permet d'étudier les effets hormonaux en l'absence d'interférences notables dues à la dDAVP administrée, comme le montre la faible pression osmotique ( $< 300 \text{ mOsm/Kg}$ ) de l'urine émise 48 heures après la fin du traitement. La spécificité de la désensibilisation observée ici est attestée par la bonne préservation de la réponse au glucagon et à la calcitonine.

La vasopressine se lie à deux types de récepteurs, qualifiés de V1 et V2 respectivement / 1 /. Les premiers sont présents à la surface des cellules du muscle lisse vasculaire et sont responsables de l'augmentation de la pression artérielle. Cet effet est indépendant de la stimulation de l'adényl-cyclase. Les effets de la vasopressine sur la réabsorption des électrolytes par le segment large ascendant / 32, 36, 37 / et sur la perméabilité à l'eau du canal collecteur / 27 / résultent en revanche de la stimulation de la cyclase, consécutive à l'occupation de récepteurs dits de type V2. La dDAVP, qui a une activité vasoconstrictrice réduite, peut ainsi être utilisée avantageusement pour désensibiliser les cellules rénales à l'AVP. Nous avons vu en effet que l'emploi de l'hormone naturelle à fortes concentrations, telles que celles requises pour induire rapidement une désensibilisation, est difficilement compatible avec des études physiologiques. En outre, la demi-vie prolongée de la dDAVP dans le plasma / 11 / permet, au moyen d'une injection quotidienne unique, de maintenir en permanence une concentration plasmatique élevée. Selon Rajerison et coll., c'est ce phénomène qui est responsable du fait que, pour une quantité équivalente de peptide, une désensibilisation plus importante de l'adényl-cyclase est observée si de la dDAVP, plutôt que de l'AVP, est administrée / 58 /.

Il était important que la concentration plasmatique de dDAVP au moment de l'expérience ait suffisamment diminué pour qu'une étude physiologique puisse être effectuée *in vivo*. Pour cette raison, nous

avons choisi d'effectuer les expériences 48 heures après la dernière injection de dDAVP. A ce moment là, l'urine émise est hypotonique, indiquant donc que la concentration de dDAVP doit être inférieure à 1 pg/ml / 25 /. Il est donc possible, grâce à ce modèle, d'étudier les effets d'une dose physiologique d'AVP.

Nos expériences montrent que, 48 heures après la fin du traitement pour la dDAVP, les effets d'une dose physiologique d'AVP sur l'excrétion de l'eau ne sont pas - ou faiblement - altérés, alors que l'effet de cette hormone sur l'excrétion du Mg est atténué de près de 60 %. Il semble donc exister une spécificité segmentaire de la désensibilisation observée, le Mg - comme nous l'avons déjà mentionné - étant réabsorbé principalement dans l'anse de Henle, alors que la réduction de la diurèse résulte de l'action de l'hormone sur le canal collecteur \*.

Afin de vérifier que l'atténuation de l'effet de l'AVP sur l'excrétion du Mg ne résulte pas d'une altération non spécifique des propriétés fonctionnelles du néphron, nous avons étudié les effets du glucagon et de la calcitonine. Nos résultats établissent sans ambiguïté que les effets de ces deux hormones sur l'excrétion du Mg sont maintenues chez les animaux désensibilisés par l'AVP.

En conclusion, ce premier travail montre qu'il est possible, *in vivo*, d'étudier les phénomènes de désensibilisation à l'AVP. Les premiers résultats obtenus par la technique des clairances suggèrent l'existence d'une spécificité hormonale et segmentaire de la désensibilisation, que nous allons maintenant nous attacher à confirmer.

---

\* L'action antidiurétique de la vasopressine intègre bien entendu de nombreux effets / 40a /. La stimulation du transport des électrolytes dans le segment large ascendant, qui contribue à l'établissement du gradient cortico-papillaire de pression osmotique est l'un de ces effets. On peut toutefois considérer que pour une administration de courte durée, la réduction de la diurèse traduit essentiellement l'action de l'hormone sur le canal collecteur / 40a /.

CHAPITRE II

MISE EN EVIDENCE PAR MICROPONCTION D'UNE  
DESENSIBILISATION DE L'ANSE DE HENLE  
A LA VASOPRESSINE

## INTRODUCTION

Au cours du chapitre précédent nous avons montré que la réponse hydroosmotique à la vasopressine n'était pas, ou faiblement, affectée par le traitement préalable des animaux à la dDAVP. En revanche, l'effet de l'hormone sur la réabsorption rénale du Mg était très fortement atténué, alors que la réponse au glucagon et à la calcitonine était maintenue. Ces données suggèrent donc fortement une désensibilisation homologue de la branche large ascendante à la vasopressine. L'objectif du travail qui va être présenté dans ce chapitre a donc été de localiser le long du néphron les segments qui rendent compte de l'effet final, au niveau urinaire. Pour cela la réponse à la vasopressine et au glucagon des segments accessibles à la microponction a été recherchée sur les néphrons superficiels de rats anormonaux ayant subi ou non un traitement de désensibilisation à la vasopressine préalable, identique à celui utilisé au cours des expériences de clairance précédentes.

## I - PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Les expériences de microponctions sont effectuées sur 25 rats Brattelboro mâles diabétiques (DI). Le poids de ces animaux au moment de l'expérience variait entre 160 et 200 g. Ces animaux sont répartis en cinq groupes expérimentaux. Un premier groupe, constitué de 5 rats anormonaux (A) sert de témoin. Un deuxième groupe de rats anormonaux (n = 5) reçoit une perfusion continue d'arginine vasopressine à raison de  $20 \text{ pg} \cdot \text{mn}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (A + AVP). Le troisième groupe d'animaux est constitué de 5 rats anormonaux recevant du glucagon à un taux de  $5 \text{ ng} \cdot \text{mn}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (A + Glu). Le quatrième et le cinquième groupes sont des rats préalablement traités à la dDAVP, qualifiés de rats désensibilisés. Le quatrième groupe (n = 5) reçoit de l'arginine vasopressine (AD + AVP) et le cinquième reçoit simultanément du glucagon et de l'arginine vaso-

pressine (AD + AVP + Glu). Les hormones sont administrées aux mêmes débits que ceux utilisés chez les rats des groupes 2 et 3.

La désensibilisation des rats est assurée par trois injections intramusculaires de dDAVP, selon les modalités décrites au chapitre précédent. Les expériences de microponctions sont réalisées 2 jours après l'arrêt du traitement. Les animaux sont préparés comme pour les expériences de clairance selon la technique décrite au chapitre "Matériel et Méthodes). Le rein gauche est exposé pour la microponction.

### I.1 - Déroulement d'une expérience

Ces expériences comportent 3 à 5 périodes de clairance de 30 minutes chacune durant lesquelles les microponctions sont effectuées. Le principe de la technique de microponction consiste à introduire une micropipette en verre de 6  $\mu$ m de diamètre externe dans une structure préalablement identifiée et à recueillir la totalité du fluide tubulaire s'écoulant en ce point du néphron pendant un temps déterminé. Les tubules sont identifiés en injectant une petite quantité (2 à 3 nl) d'une solution de vert de lissamine à 1 % dans les tubules proximaux. La disparition et la réapparition du colorant à la surface du rein permet de reconnaître la dernière convolution proximale, et la première convolution distale du néphron qui a reçu cette injection. Deux microponctions sont ensuite effectuées sur chaque néphron, la première dans la convolution distale et la seconde dans la convolution proximale, afin de déterminer la capacité de transport de l'anse de Henle et du tubule proximal, respectivement. On s'assure que la totalité du fluide s'écoulant au point de ponction a bien été collectée en introduisant une gouttelette d'huile en aval du point de ponction et en maintenant cette gouttelette immobile dans la lumière pendant la collection. La durée de collection était de 1 à 2 minutes dans les tubules proximaux et 2 à 6 minutes dans les tubules distaux. En tout 130 néphrons ont été ponctionnés, ce qui représente une moyenne de 20 à 25 néphrons pour chaque groupe de rats étudié.

## I.2 - Traitement des échantillons

A la fin de chaque expérience, les échantillons de microponction sont déposés sur des verres de montre siliconnés, sous huile de vaseline saturée d'eau. Les échantillons de microponction et de plasma sont toujours traités le jour même de l'expérience.

### - Analyse quantitative des éléments Cl, Na, P, Mg, Ca et K dans les échantillons de microponction et d'ultrafiltrat artificiel

Les mesures de concentration du Cl, Na, P, Mg, Ca et K des échantillons de fluide tubulaire et de l'ultrafiltrat plasmatique sont effectuées à l'aide d'un micro-analyseur à sonde électronique de Castaing (Cameca, Camebax), selon la technique décrite par Morel et Roinel / 52 /. Les échantillons biologiques et les solutions étalons sont déposés sous huile à la fin de l'expérience en cinq exemplaires sur un bloc de béryllium parfaitement poli. Le volume déposé, mesuré à l'aide d'une micropipette à bulbe préalablement calibrée, est de 0.2 n1. Une fois les échantillons déposés, l'huile recouvrant le bloc est dissoute dans du chloroforme et les échantillons sont déshydratés à l'air libre. Avant la mesure, ils sont réhydratés, puis congelés et lyophilisés.

L'utilisation de la sonde de Castaing pour l'analyse élémentaire quantitative d'échantillons biologiques liquides a fait l'objet de plusieurs articles / 52, 61 /. Nous ne reviendrons donc pas ici sur la technique elle-même. Rappelons simplement que les concentrations de chlore mesurées à la sonde dans les échantillons biologiques sont généralement un peu surestimées / 61 /. Pour cet élément nous ne présenterons donc pas les résultats en valeur absolue mais seulement sous forme de rapport de concentration (F/UF ou U/UF) ou en comparant les débits délivrés en deux points du néphron.

## II - RÉSULTATS

### II.1 - Fonction rénale globale

La composition de l'ultrafiltrat plasmatique et la pression osmotique plasmatique des cinq groupes de rats étudiés par microponction est indiquée dans le Tableau II.1. On n'observe aucune différence significative entre les groupes. Le Tableau II.2 montre que les rats qui ne reçoivent pas de vasopressine pendant l'expérience excrètent toujours une urine hypo-osmotique, et ont un débit urinaire élevé. On voit également que l'hormone augmente le pouvoir de concentration du rein, aussi bien chez les rats anhormonaux que chez les rats anhormonaux désensibilisés. Le  $(U/P)_{Osm}$  est même significativement plus élevé chez les rats anhormonaux désensibilisés+AVP (AD + AVP) que chez les animaux non désensibilisés recevant de l'AVP pendant l'expérience (A + AVP). Corrélativement le débit urinaire ainsi que l'excrétion fractionnaire d'eau diminuent d'une façon significative.

La filtration glomérulaire ne varie pas significativement d'un groupe à l'autre. Elle a toutefois tendance à être plus basse chez les rats anhormonaux, comme on l'observe assez régulièrement / 22, 62 /.

La figure II.1 montre que l'excrétion fractionnaire urinaire du  $Na^+$  est relativement faible chez tous les rats. Toutefois de petites différences apparaissent d'un groupe à l'autre et on peut remarquer notamment que chez les animaux recevant de la vasopressine, qu'ils soient désensibilisés ou non, l'excrétion sodée est plus basse que dans les autres groupes. Une diminution de l'excrétion sodée induite par l'administration d'AVP a déjà été rapportée chez l'animal anhormonal / 18 /. L'excrétion du potassium est très variable d'un groupe à l'autre. Elle est significativement plus basse, là encore, chez les animaux recevant de la vasopressine que chez les autres animaux. Ce comportement rénal du  $K^+$ , souvent observé, tient au fait qu'un très grand nombre de facteurs, et principalement le débit urinaire, peuvent influencer le taux de sécrétion du  $K^+$ . La sécrétion distale du K est en effet d'autant plus basse que le débit urinaire est faible / 62 /. La phosphaturie est basse, sauf bien entendu chez les animaux recevant du glucagon. Cette hormone en effet augmente systématiquement l'excrétion des phosphates, aussi bien chez l'animal intact que chez l'animal anhormonal / 4, 5, 45 /.

TABLEAU II.1 - Composition de l'ultrafiltrat plasmatique ( $\text{mmol.l}^{-1}$  ou  $\text{mOsm.kg}^{-1}$ ) dans les cinq groupes d'animaux.

	Na	K	P	Mg	Ca	Osm.
A (n=5)	157 ± 3	4.00 ± 0.06	3.54 ± 0.36	0.51 ± 0.03	1.27 ± 0.15	310 ± 2
A + AVP (n=5)	150 ± 3	4.46 ± 0.14	3.58 ± 0.23	0.52 ± 0.04	1.17 ± 0.10	310 ± 4
A + Glu (n=5)	155 ± 4	4.23 ± 0.21	3.50 ± 0.16	0.55 ± 0.03	1.19 ± 0.03	311 ± 5
AD + AVP (n=5)	153 ± 2	4.13 ± 0.17	3.97 ± 0.16	0.49 ± 0.02	1.28 ± 0.04	316 ± 1
AD + AVP + Glu (n=5)	148 ± 3	4.07 ± 0.31	3.20 ± 0.11	0.50 ± 0.03	1.22 ± 0.03	309 ± 3

TABLEAU II.2 - Valeurs moyennes du débit urinaire (V), de la filtration glomérulaire (FG), de l'excrétion fractionnaire de l'eau (EF % H<sub>2</sub>O) et du rapport des pressions osmotiques urinaires et plasmatiques (U/P<sub>0sm</sub>).

	V ( $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ )	FG ( $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ )	FG/g ( $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	EF % H <sub>2</sub> O (% quantité filtrée)	U/P <sub>0sm</sub>
A (n=5)	31 $\pm$ 5	482 $\pm$ 49	724 $\pm$ 53	6.2 $\pm$ 0.6	0.60 $\pm$ 0.07
A + AVP (n=5)	1.8 $\pm$ 0.4 *	529 $\pm$ 68	772 $\pm$ 114	0.34 $\pm$ 0.04 *	2.83 $\pm$ 0.12 *
A + Glu (n=5)	57 $\pm$ 9 *	719 $\pm$ 34	899 $\pm$ 39	7.9 $\pm$ 1.0	0.51 $\pm$ 0.05
AD + AVP (n=5)	2.8 $\pm$ 0.7 *	553 $\pm$ 28	741 $\pm$ 45	0.52 $\pm$ 0.08 *	4.15 $\pm$ 0.37 **
AD + AVP + Glu (n=5)	11.3 $\pm$ 3.2 *	679 $\pm$ 115	979 $\pm$ 163	2.2 $\pm$ 0.9 *	2.95 $\pm$ 0.76 *

\* Différence significative par rapport aux rats anhormonaux (A).

\*\* Différence significative par rapport aux rats anhormonaux et aux rats anhormonaux + AVP.

Les valeurs entre parenthèses correspondent au nombre de rats étudiés dans chaque groupe.

FG/g : filtration glomérulaire par gramme de rein.

### Excrétion fractionnaire

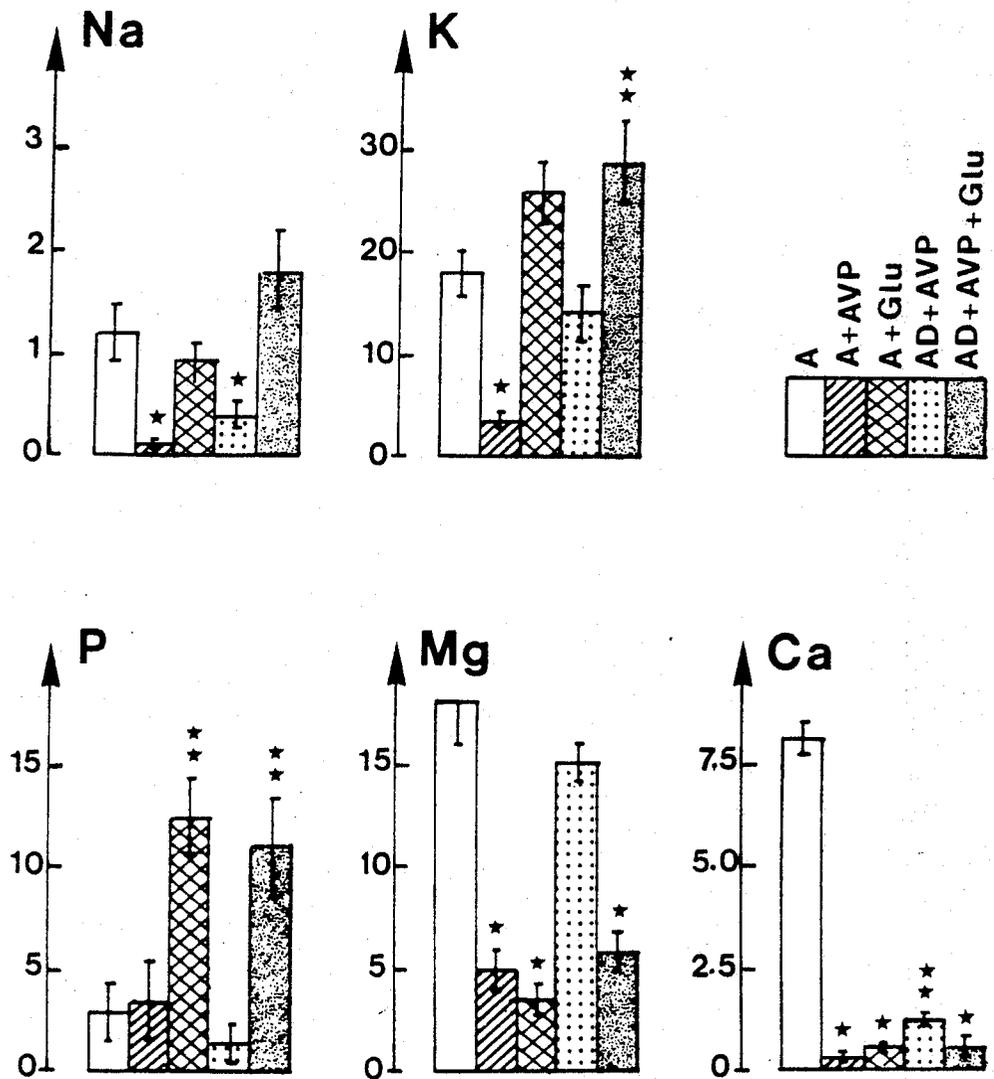


Figure II.1 - Valeurs moyennes de l'excrétion fractionnaire des électrolytes (% de la charge filtrée). Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue dans chaque expérience. Anhormonal (A) ; anhormonal + AVP à  $20 \text{ pg. mn}^{-1}$  ; anhormonal + Glu à  $5 \text{ ng. mn}^{-1}$  ; anhormonal désensibilisé + AVP et anhormonal désensibilisé + AVP + Glu.

\* : différence significative par rapport aux rats anhormonaux.

\*\* : différence significative par rapport aux rats anhormonaux et anhormonaux recevant de la vasopressine.

En revanche la situation est radicalement différente dans le cas du  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ . L'excrétion fractionnaire de ces ions est, comme l'on s'attendait, très élevée chez l'animal an hormonal. L'administration de vasopressine ou de glucagon réduit très significativement cette excrétion. Cependant, chez le rat désensibilisé on note une atténuation significative de l'effet de la vasopressine, ce qui montre que les effets du traitement préalable des rats à la dDAVP, déjà décrits au cours des expériences de clairance présentées au chapitre précédent, se retrouvent au cours de ces expériences de microponction. La figure II.2 résume l'essentiel de nos observations. Elle montre en effet qu'avant l'expérience, l'osmolalité urinaire était inférieure à  $300 \text{ mOsm.Kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$  chez les animaux désensibilisés. Ceci indique que la dDAVP administrée lors du traitement préalable a bien été éliminée. Pendant l'expérience, l'administration d'AVP augmente systématiquement l'osmolalité urinaire. L'amplitude de l'effet est toutefois variable dans cette série expérimentale. La valeur moyenne atteinte ( $1055 \pm 118 \text{ mOsm.Kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ,  $n = 10$ ) est cependant tout à fait semblable à celle mesurée chez les animaux an hormonaux en antidiurèse au cours de la même série expérimentale ( $930 \pm 25 \text{ mOsm.Kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ,  $n = 5$ ). La figure II.2 montre en outre que le glucagon, mais pas l'AVP, réduit fortement l'excrétion du Mg chez les rats désensibilisés, attestant donc de la spécificité, vis-à-vis de l'AVP, de la désensibilisation induite par la dDAVP.

Le Tableau II.3 montre que la comparaison des excrétion urinaires, exprimées en valeur absolue ( $\text{nmol.es.mn}^{-1}$ ), dans les différents groupes, conduit à des conclusions analogues à celles tirées des indications données par les mesures d'excrétion fractionnaire (exprimée en % de la quantité filtrée).

## II.2 - Tubule contourné proximal

La filtration glomérulaire des néphrons superficiels n'est pas différente chez les rats an hormonaux (A) et chez les rats recevant de la vasopressine, qu'ils soient désensibilisés ou non (Tableau II.4). Par contre, en présence du glucagon, la filtration glomérulaire augmente significativement. L'administration du glucagon, d'autre part, diminue fortement la réabsorption fractionnaire de l'eau, comme en témoignent les

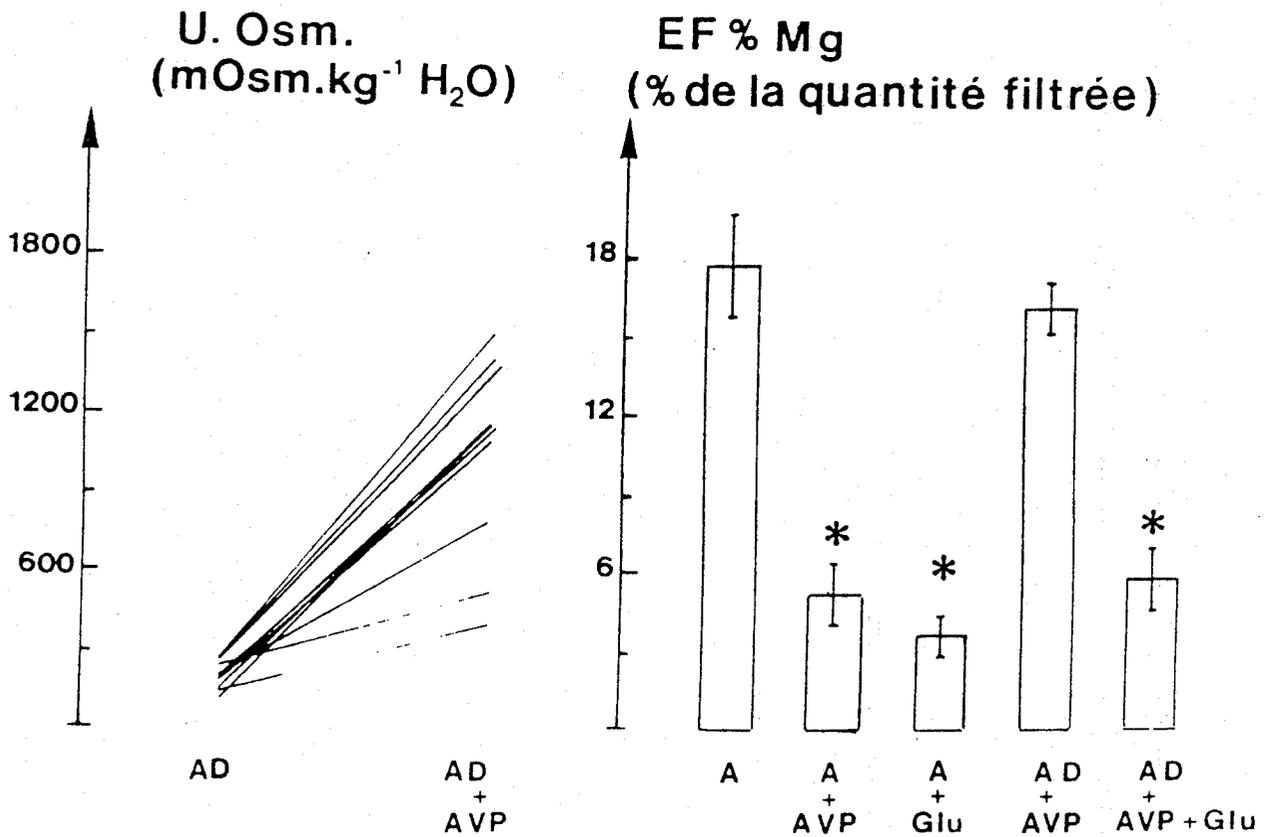


Figure II.2 - La partie gauche de la figure représente la pression osmotique urinaire chez les rats anormaux désensibilisés avant et après l'administration de la vasopressine. La partie droite de la figure représente l'effet de la vasopressine et du glucagon sur l'excrétion fractionnaire du Mg<sup>++</sup> chez les rats anormaux (A) et les rats anormaux désensibilisés (AD). Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne dans chaque expérience (n = 5 pour chaque groupe).

\* : différence significative par rapport aux rats anormaux (p < 0.05).

Débit d'administration des hormones : AVP, 20 pg.mn<sup>-1</sup>.100 g<sup>-1</sup>.

Glu, 5 ng.mn<sup>-1</sup>.100 g<sup>-1</sup>.

TABLEAU II.3 - Excrétion absolue ( $\text{mmol} \cdot \text{mn}^{-1}$  ou  $\text{nOsm} \cdot \text{mn}^{-1}$ ) des électrolytes dans les cinq groupes d'animaux.

	Na	K	P	Mg	Ca	Osm
A (n=5)	951 ± 277	355 ± 70	49 ± 25	42 ± 2	51 ± 10	5406 ± 755
A + AVP (n=5)	72 ± 21 *	83 ± 23 *	74 ± 46	16 ± 4 *	1.7 ± 0.3 *	1619 ± 362 *
G + Glu (n=5)	1033 ± 284	778 ± 10 *	311 ± 42 *	14 ± 3 *	4.6 ± 0.5 *	8450 ± 766 *
AD + AVP (n=5)	311 ± 82 *	313 ± 84	31 ± 25	43 ± 4	8.5 ± 1.1 *	3381 ± 329 *
AD + AVP + Glu (n=5)	1568 ± 202 **	732 ± 91 **	233 ± 54 **	18 ± 2 *	3.8 ± 1.4 *	7520 ± 645 **

\* Différence significative par rapport aux rats anormonaux (A).

\*\* Différence significative par rapport aux rats anormonaux et aux rats anormonaux + AVP (A + AVP).

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de rats étudiés dans chaque groupe.

TABLEAU II.4 - Valeurs moyennes de la filtration glomérulaire, et des concentrations relatives (F/P ou F/UF) à la fin du tubule proximal superficiel.

	fg (nl.mn <sup>-1</sup> )	F/P ou F/UF						
		Inuline	Cl	Na	K	P	Mg	Ca
A (5)	18±2	2.40±0.06	1.12±0.02	1.00±0.02	1.09±0.02	0.80±0.15	2.20±0.12	1.35±0.14
A+AVP (5)	20±2	2.09±0.07*	1.09±0.01	0.94±0.01*	1.01±0.03	0.53±0.12	1.92±0.06*	1.24±0.08
A+GLu (5)	25±2*	1.82±0.06*	1.13±0.03	0.99±0.04	1.06±0.01	0.69±0.06	1.81±0.06*	1.51±0.06
AD+AVP (5)	17±1	2.20±0.04*	1.15±0.02	0.98±0.01	1.12±0.05	0.44±0.06	2.05±0.09	1.36±0.05
AD+AVP+GLu(5)	26±1**	1.90±0.03**	1.13±0.02	0.99±0.01	1.07±0.04	0.69±0.04	1.73±0.07*	1.21±0.04

\* Différence significative par rapport aux rats anormaux (A).

\*\* Différence significative par rapport aux rats anormaux et aux rats anormaux + AVP.

Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre d'animaux étudiés dans chaque groupe.

valeurs de  $(F/P)_{In}$  inférieures à 2.0 à la fin du tubule contourné proximal. Une petite diminution de la réabsorption fractionnaire de l'eau est également observée en présence d'AVP. Il est toutefois important de noter que le  $F/P_{In}$  n'est pas différent chez les rats A + AVP et les rats AD + AVP.

A la fin du tube proximal les concentrations relatives (F/UF) du chlore, du K, du P, du Ca est, sauf dans un cas, du  $Na^+$ , ne sont pas différents dans les cinq groupes étudiés. La concentration relative du Mg comme celle de l'inuline est nettement abaissée chez les rats anormaux recevant du glucagon. C'est un fait bien établi que le Mg se comporte comme une substance non réabsorbable le long du tubule proximal / 44 /.

Le Tableau II.5 montre que, excepté celui du Mg et du  $PO_4$ , le débit fractionnaire de tous les éléments est augmenté chez les animaux recevant du glucagon. En présence de vasopressine, le débit fractionnaire de l'eau et du Cl est également augmenté, alors que celui du  $PO_4$  a au contraire tendance à diminuer. Notons là encore qu'il n'y a pas de différence de débit fractionnaire chez les rats A + AVP et les rats AD + AVP, indiquant donc l'absence d'effets proximaux du traitement par la dDAVP.

### II.3 - Anse de Henle

La composition du fluide délivré à l'entrée du tubule distal, c'est-à-dire à la sortie de l'anse de Henle, est donnée dans le Tableau II.6, et les débits fractionnaires sont indiqués dans le Tableau II.7. Nous n'analyserons pas ces tableaux en détail dans la mesure où l'information que l'on cherche, à savoir l'amplitude des effets hormonaux sur les transports dans l'anse ne peut être obtenue qu'à partir de la comparaison de la capacité de transport de l'anse dans les différentes conditions expérimentales. Toutefois, ces tableaux permettent quelques remarques importantes. Il apparaît déjà très clairement que chez les animaux anormaux la vasopressine et le glucagon abaissent la concentration relative du  $Mg^{++}$ , du  $Ca^{++}$  et du  $K^+$  à l'entrée du tubule distal. Cette baisse s'accompagne d'une réduction des débits fractionnaires par rapport aux animaux témoins. Les effets de la vasopressine sont nettement atténués, voire absents, chez les animaux préalablement traités par la dDAVP, indiquant

TABLEAU II.5 - Valeurs moyennes du débit fractionnaire (quantité délivrée, en % de la quantité filtrée) à la fin du tubule proximal des néphrons superficiels.

	H <sub>2</sub> O	Cl	Na	K	P	Mg	Ca
A	42.3±1.0	47.8±1.3	42.5±1.5	46.3±1.5	34.1±6.4	93.2±5.1	57.7±7.4
A + AVP	48.5±1.7*	53.1±1.7*	45.3±1.4	48.7±2	25.3±5.0	92.7±4.4	59.7±4.9
A + Glu	55.8±2.0*	63.1±2.2*	55.5±2.2*	59.1±1.8*	38.6±4.0	100 ±3.8	84.3±6.5*
AD + AVP	46.6±0.9*	53.5±1.5*	45.8±1.4	52.4±2.4*	21.0±3.3*	93.5±4	63.1±2.7
AD + AVP + Glu	53.0±0.8**	60.4±1.5**	52.7±0.9**	57 ±2**	37.0±2.5	91.8±4.6	64.4±2

\* Différence significative par rapport aux rats anormaux (A).

\*\* Différence significative par rapport aux rats anormaux et aux rats anormaux + AVP.

TABLEAU II.6 - Valeurs moyennes des concentrations relatives (F/P ou F/UF) à l'entrée du tubule distal des néphrons superficiels.

	F/P In	F/UF Cl	F/UF Na	F/UF K	F/UF P	F/UF Mg	F/UF Ca
A (n=5)	5.19±0.35	0.40±0.02	0.36±0.02	0.62±0.06	0.55±0.19	1.67±0.06	0.62±0.06
A+AVP (n=5)	6.34±0.70*	0.28±0.008*	0.29±0.004*	0.39±0.03*	0.61±0.22	0.56±0.11*	0.30±0.02*
A+Glu (n=5)	3.88±0.24*	0.30±0.01*	0.31±0.01	0.37±0.02*	0.89±0.09	0.49±0.08*	0.31±0.02*
AD+AVP (n=5)	5.60±0.25	0.39±0.02	0.35±0.02	0.53±0.02	0.23±0.08	1.13±0.07**	0.46±0.01**
AD+AVP+Glu (n=5)	4.07±0.18	0.32±0.02*	0.31±0.02	0.32±0.03*	0.85±0.08	0.50±0.05*	0.29±0.004*

\* Différence significative par rapport aux rats anormaux.

\*\* Différence significative par rapport aux rats anormaux et aux rats anormaux + AVP.

TABLEAU II.7 - Valeurs moyennes du débit fractionnaire (quantité délivrée, en % de la quantité filtrée) à l'entrée du tubule distal des néphrons superficiels.

	Débit distal						
	H <sub>2</sub> O	Cl	Na	K	P	Mg	Ca
A (n=5)	20.3±1.1	8.5±0.9	7.7±0.8	13.1±1.8	12.6±4.8	34.4±4.1	12.9±1.7
A+AVP (n=5)	17.8±1.6	5.2±0.5*	5.3±0.5*	6.7±0.8*	11.8±5.1	10.5±2.6*	5.4±0.3*
A+Glu (n=5)	27.06±1.7*	8.2±0.6	8.4±0.7	9.8±1.2*	24.0±3.3*	13.8±3.1*	8.3±0.9*
AD+AVP(n=5)	19.1±0.5	7.5±0.4	6.7±0.5	10.2±0.4	4.2±1.5	21.9±1.6**	8.8±0.3**
AD+AVP+Glu (n=5)	25.4±1.1**	8.1±0.6	7.9±0.5	8.2±0.8*	22.0±2.2	12.6±1.2*	7.5±0.3*

\* Différence significative par rapport aux rats anormaux.

\*\* Différence significative par rapport aux rats anormaux et aux rats anormaux + AVP.

un effet probable du traitement sur la réponse de l'anse à la vasopressine. En revanche, on obtient une réponse de l'anse au glucagon chez les animaux désensibilisés, comme le montre la réduction de la concentration relative et des débits fractionnaires de Mg, Ca et K à l'entrée du tubule distal.

Le Tableau II.8 indique les valeurs des quantités réabsorbées dans l'anse, exprimées en % de la quantité délivrée à cette structure. Par rapport aux animaux anhormonaux témoins, on voit que la vasopressine augmente significativement la réabsorption de l'eau. Cette augmentation n'est pas aussi nette chez les animaux désensibilisés. En ce qui concerne les phosphates, on constate que leur réabsorption fractionnaire dans l'anse est fortement abaissée chez les animaux qui reçoivent du glucagon. En revanche, la vasopressine ne modifie pas significativement cette réabsorption. Pour ce qui est des autres électrolytes, la vasopressine augmente très significativement leur réabsorption chez l'animal an hormonal. De même, le glucagon augmente également très nettement la réabsorption du K, Mg, Ca et Cl, alors que l'augmentation de réabsorption du Na est à la limite de la signification statistique.

En revanche, les effets de la vasopressine s'estompent ou disparaissent chez l'animal désensibilisé. La réabsorption fractionnaire de Cl, Na, K, Mg et Ca est en effet significativement plus faible chez les rats AD + AVP que chez les rats A + AVP. L'administration du glucagon chez les rats désensibilisés produit les mêmes effets que ceux observés chez les rats non traités. On voit donc que seule la réponse à la vasopressine a été altérée chez les animaux préalablement traités par la dDAVP. Ceci est illustré sur la figure II.3 qui montre que pour un même débit d'administration de l'AVP pendant l'expérience, les réabsorptions fractionnaires de K, Mg et Ca dans l'anse de Henle sont plus faibles chez les animaux désensibilisés que chez les rats anhornomaux non traités. La restauration d'un taux élevé de réabsorption du K, Mg et Ca par la glucagon montre la nature homologue de la désensibilisation.

Les figures II.4 et II.5 indiquent les corrélations que nous avons observées entre les quantités délivrées et les quantités réabsorbées dans l'anse de Henle. On voit que, aussi bien chez les animaux désensibilisés

que chez ceux qui ne le sont pas, des corrélations hautement significatives ( $p < 0.01$  au moins) relient les quantités réabsorbées et les quantités délivrées. Il apparaît en outre que, pour une même quantité délivrée, les quantités de Cl, Na, Mg, Ca et K réabsorbées sont toujours plus faibles chez les animaux traités par la dAVP, indiquant donc sans équivoque que la capacité de transport de l'anse de Henle est réduite chez ces animaux.

TABLEAU II.8 - Réabsorption fractionnaire des électrolytes (quantité réabsorbée, en % de la quantité filtrée) dans l'anse de Henle des néphrons superficiels.

Anse de Henle : Réabsorption fractionnaire							
	H <sub>2</sub> O	Cl	Na <sup>+</sup>	K	P	Mg	Ca
A (n=5)	51.8+3.3	82.4+2	82+2	72 +3.8	68.7+8.5	62.4+4.4	76.8+3.2
A+AVP (n=5)	63.1+3.5*	90.2+1*	88+1.2*	86 +1.6*	55.8+11	87.8+3.3*	91 +1*
A+Glu (n=5)	51.5+1.8	87.1+0.7*	85+0.9	83.4+1.7*	37.7+5.6*	87 +2.5*	90 +0.8*
AD+AVP (n=5)	58.4+1	85.8+1	85+1	80.4+0.8**	77 8+7	76.6+1.5**	85.5+0.8**
AD+AVP+Glu (n=5)	52.3+1.4	86.6+1*	85+0.8	85.6+1.3*	41.5+3*	86 +1.5*	88 +0.7*

\* Différence significative par rapport aux rats anormaux.

\*\* Différence significative par rapport aux rats anormaux et aux rats anormaux + AVP.

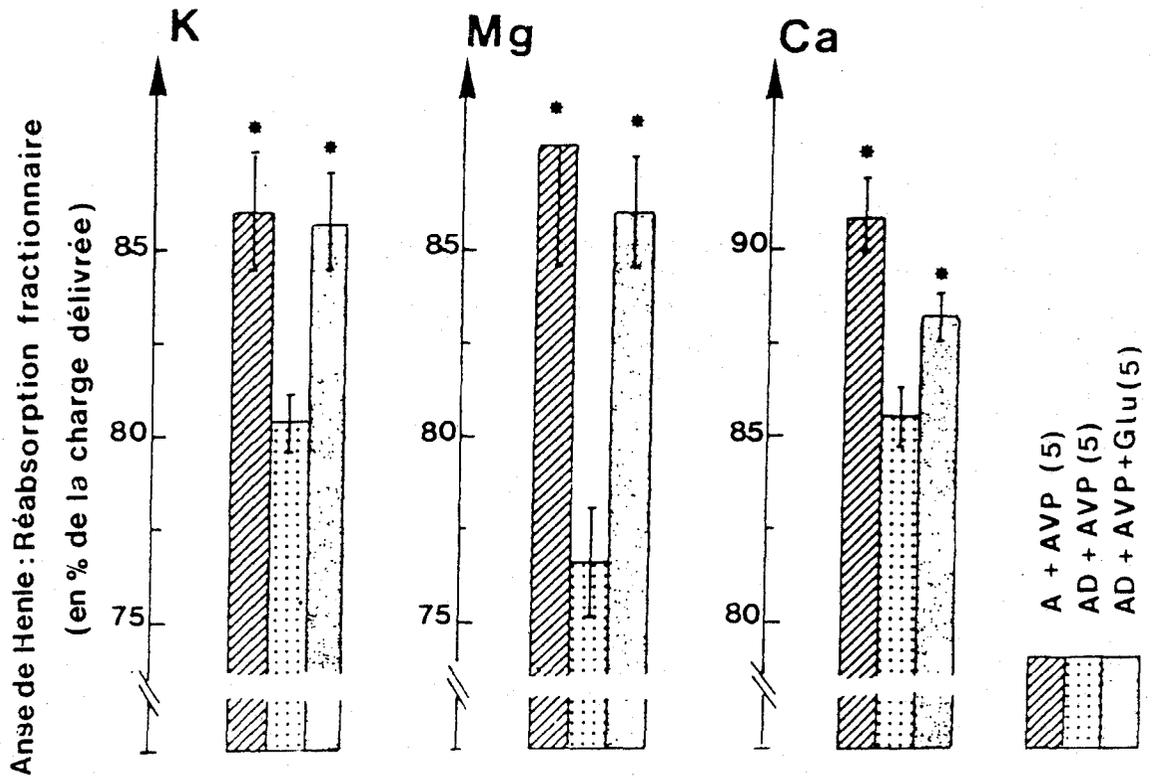


Figure II.3 - Réabsorption fractionnaire des électrolytes dans l'anse de Henle des néphrons superficiels. Chaque colonne est la moyenne des valeurs obtenues pour 5 animaux.

\* : différence significative ( $p < 0.05$ ) par rapport au groupe de rats désensibilisés recevant de la vasopressine.

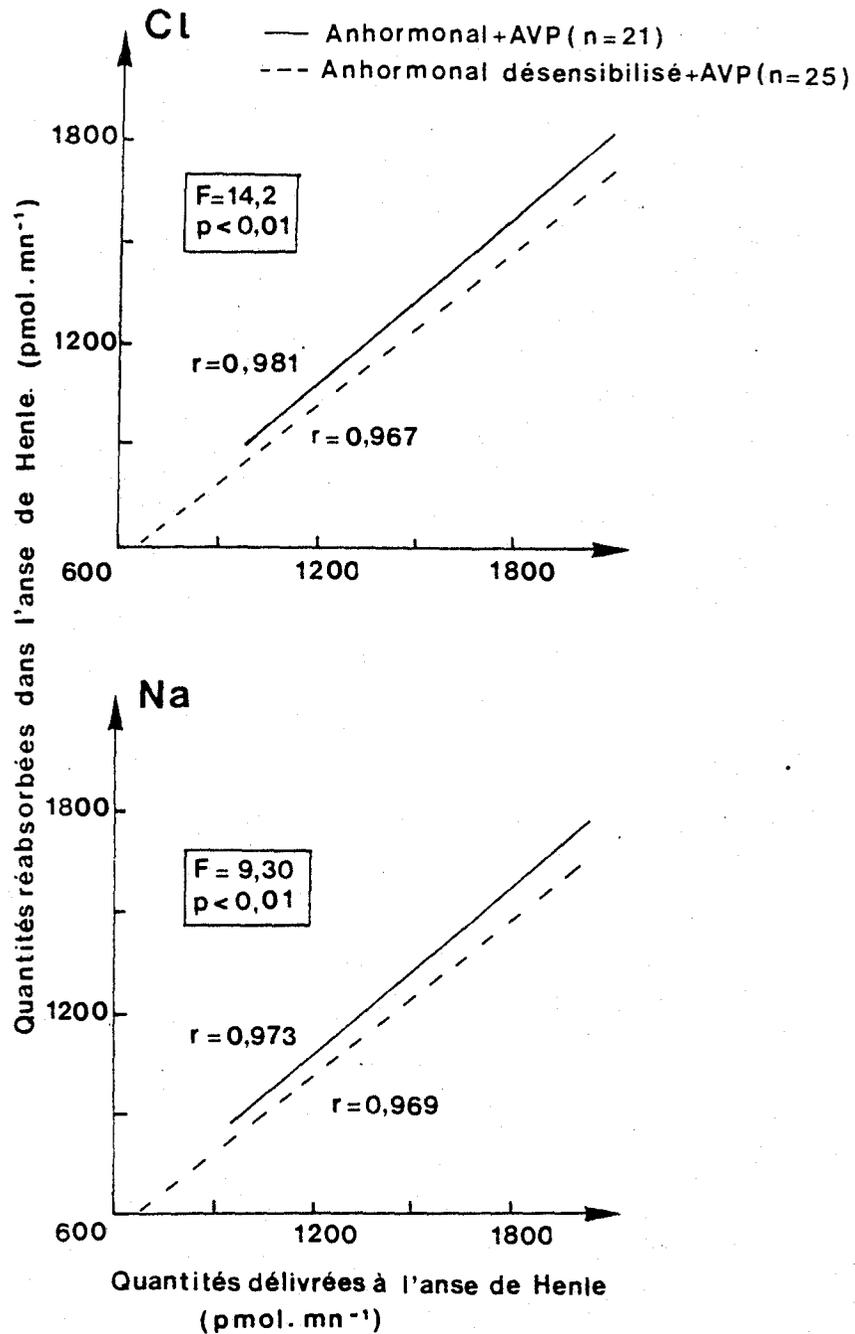


Figure II.4 - Corrélations entre les quantités de Cl et Na réabsorbées et les quantités délivrées à l'anse de Henle. Les valeurs encadrées indiquent les résultats des analyses de covariance effectuées pour comparer les droites de régression. n = nombre de tubules.

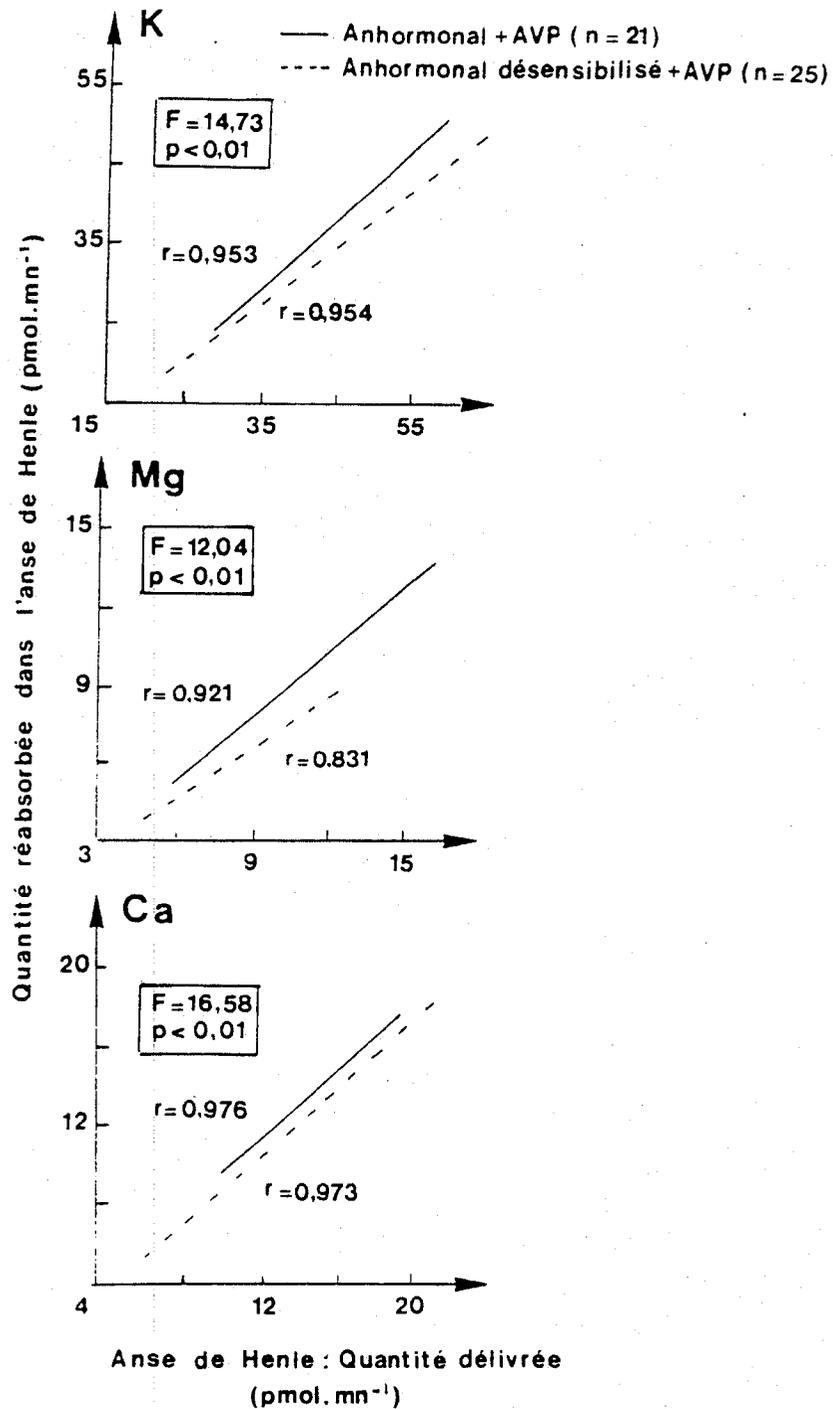


Figure II.5 - Corrélations entre les quantités de K, Mg et Ca réabsorbées et les quantités délivrées à l'anse de Henle. Les valeurs encadrées indiquent les résultats des analyses de covariance effectuées pour comparer les droites de régression. n = nombre de tubules.

## DISCUSSION

Les expériences de microponctions décrites dans ce chapitre montrent que l'atténuation de l'action à la vasopressine sur l'excrétion urinaire du Mg résulte de l'atténuation de l'effet de l'hormone sur la réabsorption de cet élément dans l'anse de Henle, et donc vraisemblablement dans la branche large ascendante. Ces résultats montrent également que cette désensibilisation s'applique aussi aux effets de la vasopressine sur les transports de Cl, Na, K et Ca dans l'anse de Henle. La désensibilisation vis-à-vis de la vasopressine est de nature homologue, puisque la réponse au glucagon n'est pas altérée par le traitement. En revanche, il semble se confirmer que la réponse à la vasopressine des canaux collecteurs soit peu, voire pas du tout, affectée. Avant de discuter ces observations, il convient d'examiner d'abord les réponses à la vasopressine et au glucagon obtenues chez l'animal an hormonal.

### 1. Effets de la vasopressine chez l'animal an hormonal

Les effets observés, aussi bien sur la fonction rénale globale que sur l'anse de Henle des néphrons superficiels sont conformes à ceux déjà décrits par le laboratoire.

Au niveau du rein, on note que l'hormone exerce, outre son effet antidiurétique classique, un effet marqué sur l'excrétion du Mg, Ca et K. Les effets sur le Mg et le Ca sont systématiquement observés. Il n'en est pas de même pour les effets de l'hormone sur le K. Ces effets sont variables d'une série expérimentale à une autre. L'excrétion du K est parfois significativement réduite par la vasopressine, alors que d'autres fois elle n'est pas modifiée. On ne sait toujours pas expliquer ce comportement aléatoire. Le taux d'excrétion du K est modulé par l'amplitude de la sécrétion distale de cet ion, qui est elle-même régie par de multiples facteurs au nombre desquels il faut compter la kaliémie, le débit d'eau intratubulaire, le taux de réabsorption du sodium et le recyclage médullaire du K / 64 /.

L'excrétion rénale du Cl est significativement diminuée sous l'effet de l'hormone, comme on l'observe généralement avec ce modèle expérimental / 18, 62 /. On note également, dans nos expériences, une diminution de l'excrétion sodée, plus rarement observée. La filtration glomérulaire n'est pas significativement modifiée par l'hormone. Elle a tendance toutefois à être très légèrement augmentée, comme on l'observe très régulièrement / 18, 19, 23 /.

Au niveau des néphrons superficiels, la vasopressine ne modifie pas le taux de filtration glomérulaire. La fonction proximale n'est pas non plus modifiée de façon notable. Les valeurs de F/P et les débits fractionnaires enregistrés à la fin du tubule proximal sont analogues à ceux déjà rapportés au cours d'un travail antérieur / 63 /. Par conséquent, les effets enregistrés au niveau du tubule distal ne peuvent résulter que de l'effet sur l'anse de Henle.

Dans l'anse de Henle, la vasopressine stimule la réabsorption d'eau. Cette observation confirme donc une observation antérieure effectuée dans ce laboratoire / 62 /. Elle diffère des observations rapportées antérieurement par Johnston et coll. / 41 / qui ne trouvaient aucune variation, et par Schnermann et coll. / 68 / qui trouvaient au contraire une diminution de cette réabsorption. En fait, tout concourt à augmenter la réabsorption de l'eau dans l'anse de Henle : la sortie d'eau de la branche descendante ne peut qu'augmenter sous l'influence du gradient longitudinal de pression osmotique / 40a /, plus prononcé en présence qu'en l'absence de vasopressine.

L'hormone stimule également le transport de Mg, Ca, K et, à moindre degré, de Na et Cl dans l'anse de Henle. Cette donnée confirme en tout point des résultats obtenus précédemment dans ce laboratoire / 62 /. Les effets sur le sodium et le chlore sont cependant plus nets dans nos expériences que lors de la série expérimentale précédente / 62 /. La raison en est simple. Au cours de la précédente série, l'inhibition de la sécrétion du glucagon était obtenue à l'aide d'une perfusion d'une solution de glucose à l'animal. Bien que la sécrétion du glucagon ait été réduite, le taux circulant d'hormone ne devait cependant pas être nul, et

devait par conséquent maintenir une certaine activité du système adényl-cyclasique de la branche large ascendante, masquant en partie les effets de la vasopressine. Cela n'était plus le cas dans nos expériences, puisque la sécrétion du glucagon était inhibée par la somatostatine, dont on sait qu'elle réduit le taux circulant du glucagon à des valeurs indétectables par les dosages radioimmunologiques les plus sensibles (seuil de détection :  $7.10^{-12}$  M) / 4 /.

La localisation des effets de la vasopressine dans l'anse de Henle est aisée en dépit de l'hétérogénéité de la structure. En effet, l'anse de Henle, telle qu'on la définit en microponction, est constituée par la fin de la partie contournée et la partie droite (pars recta) du tubule proximal, du segment grêle descendant et du segment large ascendant, avec ses portions corticales et médullaires. La réponse physiologique induite par la vasopressine ne peut résulter que d'un effet sur la branche large ascendante pour les raisons suivantes :

- 1) Il s'agit du segment qui rend compte, à lui seul, de la quasi-totalité de la réabsorption du Mg dans les néphrons superficiels / 44, 70 / ;
- 2) Seul le système adényl-cyclasique de la branche large ascendante répond à la vasopressine / 49, 51 / ;
- 3) Enfin, les données obtenues *in vitro* par la technique de microperfusion de tubules isolés, montrent que la vasopressine augmente la différence de potentiel transépithéliale de la portion médullaire du segment large ascendant en augmentant le flux de transport du chlore / 30, 32, 36, 37 /.

## 2. Effets du glucagon chez l'animal an hormonal

Au niveau rénal, on retrouve les effets globaux déjà décrits du glucagon sur l'excrétion urinaire de l'eau et des électrolytes.

On note en particulier que, comme l'AVP, le glucagon diminue fortement l'excrétion urinaire du Mg et du Ca. D'autre part, il augmente l'excrétion de  $PO_4$  et tend à augmenter la filtration glomérulaire, de façon non significative toutefois dans cette série expérimentale.

Au niveau des néphrons superficiels, on retrouve une augmentation, significative cette fois-ci, du taux de filtration glomérulaire. Au niveau proximal, on note une baisse de la réabsorption fractionnaire de l'eau : le  $F/P_{in}$  est inférieur à 2. On peut légitimement se demander s'il ne s'agit pas là d'un effet physiologique de l'hormone, car cette observation a déjà été rapportée par C. Bailly et coll. qui ont trouvé une valeur de  $F/P_{in}$  très voisine de celle que nous avons mesurée ( $F/P_{in} = 1.90 \pm 0.10$  contre  $1.82 \pm 0.06$  dans notre étude). Or le glucagon n'exerce aucun effet sur le système adényl-cyclasique du tubule proximal. Une autre voie de couplage pourrait être impliquée et, en tout premier lieu, on peut naturellement penser à la voie de la phospholipase C.

L'augmentation des quantités filtrées et l'inhibition de la réabsorption proximale de l'eau et des électrolytes concourent donc à l'augmentation des quantités d'eau et d'électrolytes délivrées à l'anse. En dépit de cette situation peu favorable, nos expériences indiquent une stimulation claire par le glucagon de la réabsorption du Ca, Mg, K et Cl dans l'anse de Henle, puisque la réabsorption fractionnaire de chacun de ces ions (exprimée en fonction de la quantité délivrée) augmente. Un effet sur la réabsorption du Ca, du Mg et du K avait déjà été rapporté / 4 /. En revanche, aucun effet de l'hormone n'avait été noté, ni sur le chlore ni sur le sodium. Cette absence d'effet a été mis sur le compte de l'accroissement des quantités de Cl et de Na délivrées à l'anse de Henle, secondaire à l'inhibition de la réabsorption proximale de Cl et Na. On sait en effet, à partir des données de microperfusion *in vitro* / 30 /, que la fraction de Na et Cl délivrée à la branche large ascendante et qui est réabsorbée par cette structure est d'autant plus petite que le débit délivré est grand.

Dans nos expériences, le taux de filtration glomérulaire des néphrons superficiels était plus bas ( $27 \pm 1.7$  nl/min) que dans celles effectuées par C. Bailly et coll. ( $38.1 \pm 2.2$  nl/min). Cela explique probablement le fait que l'on ait pu cette fois-ci mettre en évidence un effet significatif sur le transport du chlore. En ce qui concerne le transport du Na, l'effet est à la limite de la signification statistique. Une comparaison directe (excluant les autres groupes pris en compte dans

l'analyse de variance) de la réabsorption fractionnaire du Na mesurée chez l'animal an hormonal et chez l'animal an hormonal recevant du glucagon fait apparaître une différence significative entre les deux moyennes ( $P < 0.01$ ). A partir de cela, on peut conclure que le glucagon stimule la réabsorption du NaCl dans l'anse de Henle.

La localisation des effets du glucagon sur le transport du Mg, Ca, K, Cl et Na dans l'anse de Henle, relève des mêmes arguments que ceux développés pour localiser les effets de la vasopressine. Il ne peut là encore s'agir que d'effets exercés par l'hormone sur la branche large ascendante. Cette conclusion ne peut être, pour le moment, corroborée par aucune expérience de microperfusion de tubule isolé, si l'on excepte les travaux de Culpepper et Andreoli / 15 / et de Wittner et Di Stefano / 79 / qui ont permis de montrer que le glucagon augmente la différence de potentiel transépithéliale de la branche large ascendante de souris, ce qui va dans le sens de nos observations.

Contrairement à la vasopressine, le glucagon inhibe le transport de phosphate dans l'anse de Henle. Il s'agit d'un fait déjà observé par C. Bailly / 4 /. Cet effet rend compte de la phosphaturie. Il ne s'agit probablement pas là d'un effet direct de l'hormone. Le glucagon augmente en effet le taux circulant d'AMP cyclique, comme cela a été décrit par Broadus et coll. chez l'homme / 8 /. Or une augmentation de la concentration circulante d'AMP cyclique est connue pour augmenter la phosphaturie / 12, 42 /. L'inhibition de la réabsorption de phosphate dans l'anse de Henle par le glucagon a lieu probablement dans les pars recta. C'est en effet le seul segment de l'anse de Henle qui assure un transport net de cet ion / 41a /.

### 3. Effets de la vasopressine et du glucagon chez les rats préalablement traités par la dDAVP

Cette étude démontre que, lorsque l'on élève très fortement la concentration circulante de dDAVP, on induit une réduction marquée de la réponse de la branche large ascendante à la vasopressine *in vivo*. Le fait que la réponse au glucagon soit inaltérée indique que cette désen-

sibilisation est de type homologue, puisque cette hormone agit sur le même "pool" d'adényl-cyclase que la vasopressine.

Une réduction importante du nombre de récepteurs / 9 / et de la sensibilité à la vasopressine du système adényl-cyclasique / 9, 58 / sous l'effet de l'administration intramusculaire de dDAVP à des doses identiques à celles utilisées ici (2 µg/jour), avait déjà été observée sur des membranes préparées à partir de médullaire rénale de rats. Cette "down regulation" était décelable dès la première heure qui suivait l'administration de dDAVP / 9 /. Quand la dDAVP était administrée de façon chronique (pendant 18 jours) et au même taux que précédemment, on observait aussi une désensibilisation qui persistait au moins 24 heures après la fin du traitement / 58 /. En raison du protocole, ces études ne permettaient toutefois pas de déterminer la nature (branche large ascendante ou canal collecteur) des segments touchés par cette désensibilisation. Nos expériences indiquent clairement que la réponse physiologique à la vasopressine de la branche large ascendante est plus touchée que celle des canaux collecteurs. En effet, les deux séries expérimentales présentées tant au Chapitre I qu'au Chapitre II montrent que l'augmentation de l'osmolalité urinaire induite par l'AVP n'est pas modifiée significativement chez les animaux traités. En second lieu, nous avons observé que lors du traitement par la dDAVP, l'osmolalité urinaire augmente progressivement pour atteindre 1.400-1.500 mOsm/Kg au cours du troisième jour de traitement (cf. Chapitre I). En cas de désensibilisation des canaux collecteurs, l'osmolalité urinaire devrait au contraire diminuer progressivement. Bien que les techniques utilisées ici ne permettent pas d'étudier directement la fonction du canal collecteur, il semble donc bien que celui-ci ne soit pas, ou bien très faiblement, désensibilisé à l'AVP.

Les études de liaison effectuées à l'aide de vasopressine tritiée sur des homogénats de médullaire rénale de rat, montrent l'existence d'une seule classe de récepteurs  $V_2$  / 11, 59 /. Des travaux effectués sur des fragments tubulaires obtenus par microdissection montrent cependant que le  $K_m$  d'activation apparent du système adényl-cyclasique est plus élevé dans la branche large ascendante que dans le canal collecteur / 40, 53 /.

En conséquence, la concentration d'hormone requise pour induire une réponse biologique est plus élevée (4 à 5 fois) dans le cas de la branche large ascendante que dans celui du canal collecteur / 20 /. Selon Morel et coll. / 53 / la différence de sensibilité à la vasopressine entre les deux segments pourrait résulter du couplage à l'unité cyclasique d'un nombre de récepteurs  $V_2$  plus élevé dans le canal collecteur que dans la branche large ascendante. Dès lors, pour une concentration circulante d'hormone induisant le même taux d'occupation relative des récepteurs dans les deux segments, la réponse du système adényl-cyclasique serait plus grande dans les canaux collecteurs que dans la branche large ascendante. Si cette hypothèse est correcte, il n'est alors pas surprenant qu'une réponse physiologique à la vasopressine soit maintenue dans les canaux collecteurs des animaux désensibilisés alors que la réponse de la branche large ascendante est franchement réduite. On peut en effet s'attendre à ce qu'une réduction analogue du nombre de récepteurs accessibles à l'hormone à la surface de la cellule entraîne un défaut de réponse plus marqué pour la branche large ascendante que pour les canaux collecteurs, dont les unités cyclasiques sont couplées à un plus grand nombre de récepteurs.

Au cours de notre étude, des doses très élevées de dDAVP furent administrées afin de produire une désensibilisation aussi rapide que possible. On peut donc se poser la question de la signification physiologique de nos observations. Une telle désensibilisation peut elle être observée naturellement ? Il semble en fait que oui. En effet, si on supprime l'eau de boisson à des gerboises pendant plusieurs semaines, on s'aperçoit que le taux circulant d'AVP augmente considérablement (jusqu'à 500 pg/ml) / 6, 9 /. Corrélativement on note sur des membranes préparées à partir d'homogénats de médullaire de rein, une diminution du nombre de récepteurs et de la sensibilité du système adényl-cyclasique à la vasopressine / 9 /. De plus, un autre travail effectué chez ces animaux a montré que la désensibilisation de la réponse du système adényl-cyclasique à l'AVP était significative dans les branches larges ascendantes médullaires, mais pas dans les canaux disséqués au même niveau de la medulla du rein / 6 /, indiquant donc que, comme chez le rat, les deux segments cibles de l'ADH pouvaient être désensibilisés indépendamment l'un de

l'autre. De même, ces études sur la gerboise ont montré que la désensibilisation était de type homologue, puisque les effets du glucagon sur la cyclase n'étaient pas réduits, mais au contraire augmentés chez les animaux désensibilisés.

Dans plusieurs systèmes cellulaires la réapparition d'une réponse normale à une hormone après désensibilisation s'est montrée lentement réversible / 35, 38, 72 /, même lorsqu'une synthèse de novo de protéine n'était pas requise pour le processus de resensibilisation / 16, 35 /. On peut donc se demander ici si tel est le cas pour la réponse de la branche large ascendante à la vasopressine. Cet aspect de la question fait l'objet du dernier chapitre de ce mémoire.

CHAPITRE III

---

REVERSIBILITE DE LA DESENSIBILISATION  
INDUITE PAR LA  $\alpha$ DAVP

La désensibilisation aux hormones peptidiques, qu'elle soit homologue ou hétérologue, est un phénomène observé dans les minutes suivant l'exposition du tissu cible à l'hormone. Dans le cas d'une désensibilisation homologue, qui est celui qui nous intéresse ici, le récepteur est la principale (voire la seule) cible moléculaire affectée. La diminution de la réponse cellulaire à l'hormone accompagne / 60 / ou précède / 72 / la diminution du nombre de récepteurs membranaires. Dans des cultures primaires d'hépatocytes, par exemple, Refsnes et al. ont noté une diminution concomitante du nombre de récepteurs aux catécholamines et de la stimulation de l'adénylate cyclase / 60 /. En revanche, dans certaines lignées cellulaires en culture, on note une diminution très précoce (elle se manifeste en moins d'un quart d'heure) du taux de stimulation de la cyclase par une hormone donnée et, ultérieurement (temps d'apparition d'environ une demi-heure) une diminution du nombre de récepteurs / 72 /. Si les étapes initiales du phénomène sont donc à définir pour chaque modèle cellulaire, les séquences suivantes semblent présenter un caractère plus général / 71 /. Lorsque la concentration d'hormone au contact des cellules cibles reste élevée, un découplage du récepteur et des autres éléments (protéine G, unité catalytique de la cyclase) du système de transduction membranaire apparaît. Le récepteur est ensuite internalisé puis suit, à l'intérieur de la cellule, un cycle complexe aboutissant soit à sa dégradation, soit à son recyclage vers la membrane plasmique.

L'étude du cycle du récepteur de la vasopressine dépassait bien évidemment le but de notre travail, qui est pour l'heure la validation d'un modèle permettant d'étudier la désensibilisation du néphron de mammifères. Il nous est toutefois apparu important, dans ce cadre-ci, d'étudier la réversibilité de la désensibilisation induite par le dDAVP. Le caractère réversible du phénomène permettrait en effet de confirmer sa spécificité, déjà attestée par le maintien de la réponse au glucagon et à la calcitonine.

## I - MÉTHODES

Les expériences sont réalisées sur cinq groupes de rats anormaux dont le poids corporel est compris entre 160 et 200 g. Le premier groupe est constitué de rats anormaux, le second de rats anormaux recevant de l'AVP (20 pg/min.100 g) durant l'expérience. Les trois autres groupes sont constitués de rats anormaux désensibilisés par la dDAVP au moyen du traitement indiqué au Chapitre I. Les animaux sont étudiés 2 jours, 5 jours ou 7 jours après la dernière injection de dDAVP et reçoivent pendant l'expérience de l'AVP à un débit de 20 pg/mn.100 g. Le déroulement d'une expérience est en tout point analogue à celui décrit au Chapitre I. Le nombre de rats étudiés dans chacun des groupes est égal à 5.

Pour cette étude, seules des mesures de clairance ont été effectuées. Les expériences de microponctions présentées au Chapitre II ont en effet montré que l'excrétion urinaire du Mg est un reflet fidèle de son comportement dans l'anse de Henle / 23, 24 /. Ce fait est illustré par les données présentées dans la figure III.1 qui montrent que l'on peut rendre totalement compte de l'atténuation des effets de la vasopressine sur l'excrétion urinaire du Mg chez les animaux désensibilisés par une augmentation du débit délivré à l'entrée du tubule distal. L'augmentation du débit de Mg (exprimé en % de la charge filtrée) chez les animaux désensibilisés, est en effet quantitativement similaire à l'entrée du tubule distal et dans l'urine finale (10-12 % de la charge filtrée dans les deux cas). Le débit fractionnaire du Mg à la fin du tubule proximal n'est en revanche pas altéré. Incidemment, cette figure montre que lors de l'administration de glucagon, la variation du débit fractionnaire de Mg à l'entrée du tubule distal permet, là encore, de rendre compte des modifications d'excrétion urinaire. Nous avons donc, pour cette étude, comme au Chapitre I, évalué le comportement du Mg dans l'anse de Henle d'après son débit d'excrétion urinaire. La pression osmotique urinaire et le débit d'excrétion de l'eau ont également été mesurés pour vérifier la présence d'un effet de la vasopressine sur les canaux collecteurs.

### Mg fraction délivrée (% de la charge filtrée)

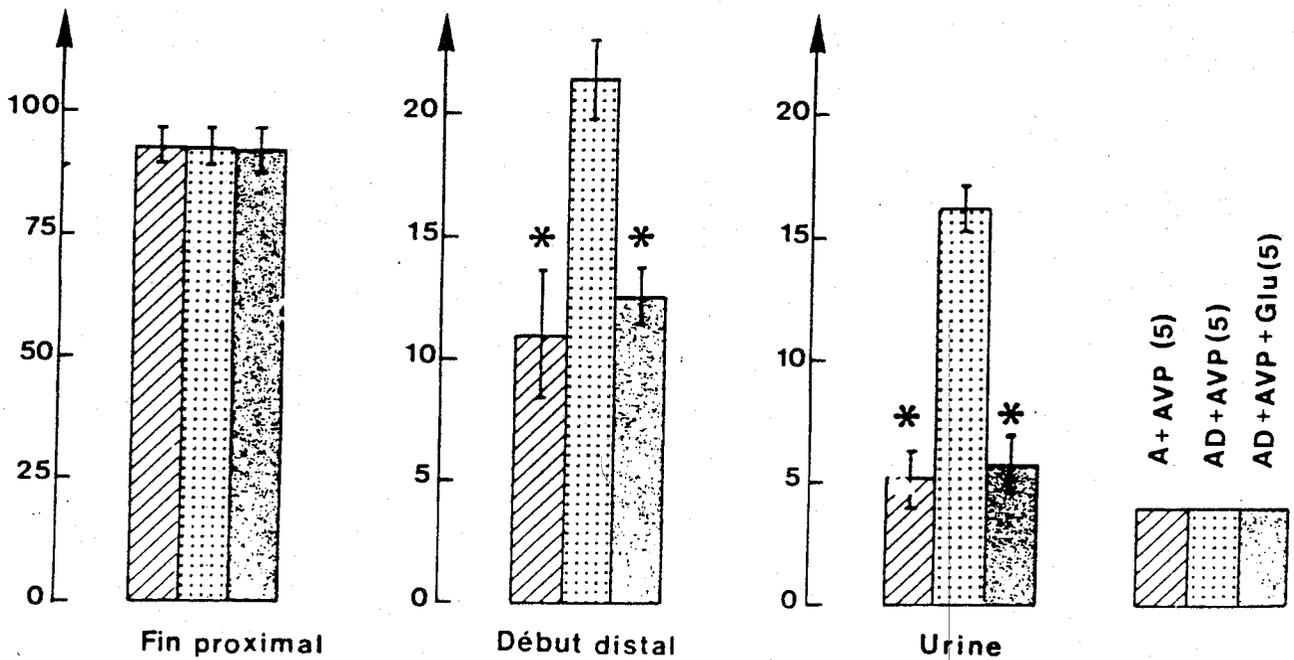


Figure III.1 - Débit de Mg (en % de la charge filtrée) à la fin du tubule proximal, à l'entrée du tubule distal des néphrons superficiels et dans l'urine urétérale. Chaque colonne représente la moyenne des valeurs obtenues sur 5 animaux différents étudiés par la technique de micro-ponctions (les données correspondent aux expériences présentées au Chapitre II).

## II - RÉSULTATS

La composition plasmatique moyenne des cinq groupes d'animaux étudiés est indiquée dans le tableau III.1. On ne note pas de différence majeure d'un groupe à l'autre. La kaliémie est toutefois légèrement plus élevée chez les rats A + AVP que dans les autres groupes, tandis que l'osmolalité est, au contraire, plus basse. La phosphatémie est élevée et la calcémie basse dans tous les groupes, conséquence de la thyroïdectomie aiguë.

Le tableau III.2 donne les résultats concernant la filtration glomérulaire, l'excrétion de l'eau et le pouvoir de concentration du rein. Aucune différence de filtration glomérulaire n'apparaît d'un groupe à l'autre. Le débit urinaire, et l'excrétion fractionnaire de l'eau, sont plus faibles chez les animaux recevant de l'AVP que chez les rats anhormonaux témoins. L'excrétion de l'eau n'est pas différente, que les animaux aient été traités ou non par la dDAVP, et que l'expérience soit effectuée 2 jours, 5 jours ou 7 jours après l'arrêt du traitement. Le  $U/P_{Osm}$  tend à être plus faible, de façon non significative toutefois chez les animaux étudiés 2 jours après l'arrêt du traitement que chez les rats anhormonaux + AVP non désensibilisés. Par contre, la différence est significative vis-à-vis des rats étudiés 5 jours après l'arrêt du traitement : AD + AVP (2 jours),  $U/P_{Osm} = 2.8 \pm 0.4$  ; AD + AVP (5 jours),  $U/P_{Osm} = 3.8 \pm 0.3$ ,  $t = 2.47$  ( $p < 0.05$ ).

Le comportement rénal des solutés est résumé dans les tableaux III.3 et III.4, où sont indiqués respectivement les valeurs d'excrétion fractionnaire et les quantités excrétées. Les deux modes d'expression des résultats donnent la même information. A l'exception de l'excrétion du phosphate, qui n'est pas affectée, l'excrétion de tous les solutés est plus basse chez les rats anhormonaux + AVP que chez les rat anhormonaux témoins. Ces résultats sont donc analogues à ceux présentés au Chapitre II pour l'étude réalisée par microponctions. L'excrétion du Mg, mais également du Na, est plus élevée chez les animaux désensibilisés étudiés 2 jours après l'arrêt du traitement que chez les rats non désensibilisés + AVP.

TABLEAU III.1 - Composition plasmatique moyenne des cinq groupes d'animaux. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience, et sont exprimées en  $m.mol.l^{-1}$  ou  $mOsm.Kg^{-1}.H_2O$ . La vasopressine est administrée à un débit de  $20 pg.min^{-1}.100 g$  chez tous les groupes de rats recevant cette hormone.

	Na	K	P $m.mol.l^{-1}$ ou $mOsm.Kg^{-1}.H_2O$	Mg $mOsm.Kg^{-1}.H_2O$	Ca	Osm
A (n=5)	157+1	3.66+0.11	3.79+0.13	0.52+0.01	1.97+0.09	312+3
A + AVP (n=5)	151+2	4.33+0.14*	3.95+0.12	0.53+0.01	1.97+0.09	302+5*
AD + AVP (n=5) (2 jours)	149+3	3.65+0.09	3.21+0.12*	0.50+0.01	2.09+0.09	317+2
AD + AVP (n=5) (5 jours)	148+5	4.06+0.23	3.65+0.07	0.58+0.04	2.38+0.07**	323+2
AD + AVP (n=5) (7 jours)	152+2	4.12+0.11	3.69+0.08	0.55+0.02	2.15+0.08	322+3

\* : différence significative par rapport aux rats anhormonaux.

\*\* : différence significative par rapport aux rats anhormonaux et aux rats anhormonaux non désensibilisés recevant la vasopressine (A + AVP).

TABLEAU III.2 - Valeurs moyennes de filtration glomérulaire (FG), du débit urinaire (V), de l'excrétion fractionnaire (EF) de l'eau et du rapport de la pression osmotique urinaire sur la pression osmotique plasmatique (U/P)<sub>Osm</sub>. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience. L'AVP est administrée à 20 pg.min<sup>-1</sup>.100 g<sup>-1</sup>.

	GFR ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	V ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	EF % H <sub>2</sub> O (quantité excrétée)	U/P <sub>Osm</sub>
A (n=5)	634 $\pm$ 48	58.7 $\pm$ 3.6	9.4 $\pm$ 0.9	0.50 $\pm$ 0.02
A + AVP (n=5)	605 $\pm$ 41	4.3 $\pm$ 1.1*	0.7 $\pm$ 0.1*	3.2 $\pm$ 0.2 *
AD + AVP (n=5) (2 jours)	612 $\pm$ 64	6.7 $\pm$ 2.3*	1.2 $\pm$ 0.4*	2.8 $\pm$ 0.4*
AD + AVP (n=5) (5 jours)	609 $\pm$ 60	2.75 $\pm$ 0.53*	0.46 $\pm$ 0.08*	3.8 $\pm$ 0.3*
AD + AVP (n=5) (7 jours)	671 $\pm$ 37	4.08 $\pm$ 0.47*	0.61 $\pm$ 0.05*	3.2 $\pm$ 0.1*

\* : différence significative par rapport aux rats anormaux.

TABLEAU III.3 - Valeurs moyennes de l'excrétion fractionnaire des électrolytes et des solutés totaux. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience. Le débit d'administration de la vasopressine est de  $20 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ .

	Excrétion fractionnaire					
	Na	K	P	Mg	Ca	Osm
A (n=5)	2.5 $\pm$ 0.4	30.8 $\pm$ 5.3	3.35 $\pm$ 0.96	19.9 $\pm$ 1.0	8.4 $\pm$ 1.2	4.7 $\pm$ 0.4
A + AVP (n=5)	0.55 $\pm$ 0.20*	11.1 $\pm$ 1.5*	3.15 $\pm$ 1.35	6.5 $\pm$ 1.2*	1.0 $\pm$ 0.4*	2.2 $\pm$ 0.3*
AD + AVP (n=5) (2 jours)	1.9 $\pm$ 0.5**	20.4 $\pm$ 3.2	1.0 $\pm$ 0.6	15.9 $\pm$ 1.5**	1.3 $\pm$ 0.7*	3.2 $\pm$ 0.6
AD + AVP (n=5) (5 jours)	0.27 $\pm$ 0.11*	10.1 $\pm$ 1.9*	3.8 $\pm$ 1.3	8.9 $\pm$ 0.6*	0.7 $\pm$ 0.3*	2.8 $\pm$ 0.6*
AD + AVP (n=5) (7 jours)	0.26 $\pm$ 0.09*	10.9 $\pm$ 3.5*	2.5 $\pm$ 1.3	8.6 $\pm$ 0.9*	0.4 $\pm$ 0.06*	1.9 $\pm$ 0.2*

\* : différence significative par rapport aux rats ahnormonaux.

\*\* : différence significative par rapport aux rats ahnormonaux non désensibilisés recevant de l'AVP (A + AVP).

TABLEAU III.4 - Valeurs moyennes de la quantité excrétée des électrolytes et des solutés totaux. Les valeurs obtenues ont été calculées en prenant la moyenne pour chaque expérience.  
 A + AVP, 20 pg.mn<sup>-1</sup>.100 g ; AD + AVP, 20 pg.mn<sup>-1</sup>.100 g.

	Quantités excrétées (nmol ou nOsm.mn <sup>-1</sup> )					
	Na	K	P	Mg	Ca	Osm
A (n=5)	2427+292	697+104	78.5+20.5	55+3	100 +8	9162+644
A + AVP (n=5)	405+218*	300+ 45*	67 +28	17+3*	11.7+5.0*	3736+674*
AD + AVP (n=5) (2 jours)	1801+676**	470+109	23.1+14.6	47+7**	17.5+4.8*	6516+1736
AD + AVP (n=5) (5 jours)	248+ 96*	241+ 51*	73 +23	26+3*	8 +3*	3171+468*
AD + AVP (n=5) (7 jours)	269+108*	290+101*	63 +32	27+3*	5.8+1.0*	4107+506*

\* : différence significative par rapport aux rats anormaux.

\*\* : différence significative par rapport aux rats anormaux non désensibilisés recevant la vasopressine (A + AVP).

Pour le potassium, la différence n'atteint pas la signification statistique ( $t = 1.95$  ,  $0.10 < p < 0.05$ ).

Les expériences effectuées 5 jours et 7 jours après l'arrêt du traitement démontrent la réversibilité de la désensibilisation. Chez les animaux étudiés 5 jours ou 7 jours après la dernière injection de dDAVP, l'excrétion du Mg est en effet plus basse que chez les animaux étudiés 2 jours seulement après cette dernière injection. Une diminution significative est également observée pour le Na et pour le K dans l'un des deux groupes (i.e. AD + AVP, 5 jours). On peut d'ailleurs noter que l'excrétion fractionnaire du Na et du K est pratiquement identique chez les animaux non désensibilisés recevant de l'AVP et ceux étudiés 5 jours ou 7 jours après la fin du traitement. Ceci suggère que la désensibilisation de l'anse de Henle pourrait être responsable d'une augmentation, en plus de celle du Mg, de l'excrétion du Na et du K. Il faut toutefois rester prudent dans l'analyse de ces résultats, l'effet de l'AVP sur l'excrétion du Na et du K, contrairement à celui sur le Mg, n'étant pas systématiquement observé / 18, 23, 62 /.

L'action désensibilisante d'une dose pharmacologique de dDAVP et la réversibilité du phénomène sont illustrés sur la figure III.2. L'atténuation de l'effet de l'AVP sur l'excrétion du Mg, observé 2 jours après l'arrêt du traitement, a en effet pratiquement totalement disparue dès le 5ème jour.

## DISCUSSION

Cette étude, montrant la réversibilité de la désensibilisation induite par la dDAVP, confirme le caractère spécifique de celle-ci ainsi que la validité du modèle expérimental élaboré. Une réduction de l'excrétion du Mg, comparable à celle observée chez les animaux non traités, apparaît dès le 5ème jour suivant la dernière injection de dDAVP.

Les études de la cinétique de désensibilisation et de resensibilisation aux hormones peptidiques effectuées sur divers types cellulaires

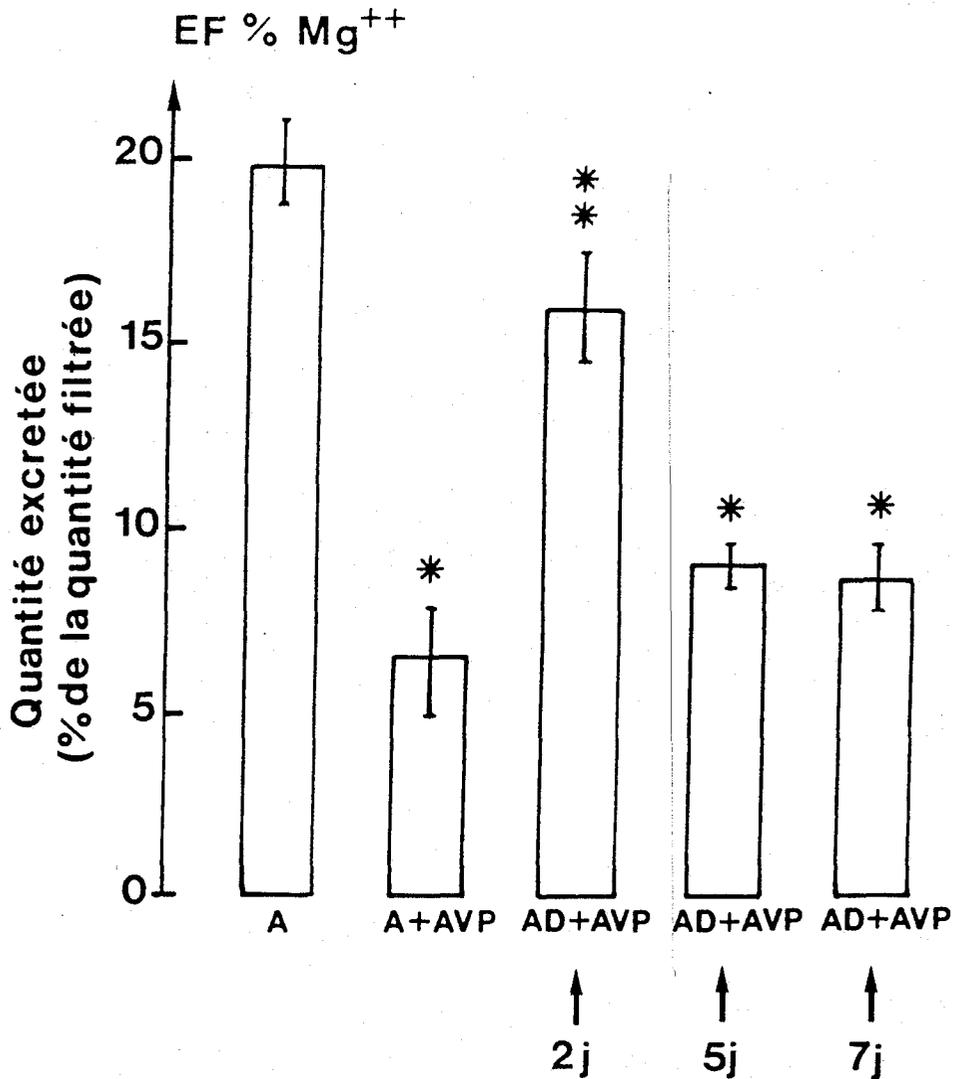


Figure III.2 - Excrétion fractionnaire urinaire du Mg chez les rats anormaux (A), les rats anormaux recevant de l'AVP (A + AVP) et les animaux désensibilisés étudiés 2 jours, 5 jours ou 7 jours après l'arrêt du traitement de désensibilisation. Ces animaux reçoivent de l'AVP pendant l'expérience à un débit identique à celui administré aux rats A + AVP ( $20 \text{ pg} \cdot \text{mn}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ).

\* : différence significative par rapport aux rats anormaux.

\*\* : différence significative par rapport aux rats anormaux et aux rats anormaux + AVP non désensibilisés (A + AVP).

ont permis de dégager les observations suivantes :

- (1) une désensibilisation peut être observée dès le premier quart d'heure suivant l'exposition à l'hormone / 60, 72 / ;
- (2) l'amplitude de la désensibilisation dépend de la concentration d'hormone et du temps d'exposition du tissu cible à celle-ci / 43, 71 / ;
- (3) enfin, la cinétique de resensibilisation dépend, elle aussi, du temps d'exposition à l'hormone / 60, 72 /.

Ce dernier phénomène a été analysé dans plusieurs études remarquables, effectuées sur des cellules prélevées après traitement préalable de l'animal / 38, 55 /, ou encore sur des cultures cellulaires / 60, 72 /. Dans certains cas le rôle d'une synthèse protéique dans la reprise d'une réponse normale à l'hormone a pu être étudié grâce à l'emploi de cycloheximide. La conclusion qui se dégage de ces travaux est leur faible valeur heuristique. Il n'est pas possible en effet d'en tirer de règles d'application générale. Sans prétendre à l'exhaustivité dans ce domaine, il suffit de signaler que dans divers types de cellules en culture / 60, 72 /, la désensibilisation aux catécholamines est rapidement réversible et indépendante d'une synthèse protéique pour des temps d'incubation  $\leq 1$  heure, et qu'elle est en revanche dépendante d'une telle synthèse, et beaucoup plus lente, pour des temps d'incubation plus prolongés. Même pour des temps d'exposition à l'hormone de plusieurs heures, la réversibilité ne nécessite toutefois pas toujours une synthèse protéique. Une étude effectuée chez la grenouille par Mukherjee et al., montre en effet que la désensibilisation homologue des érythrocytes induite par des injections répétées d'isoprotérénol à l'animal pendant 24 heures, est réversible même lorsque du cycloheximide est administré simultanément / 55 /. Il n'est ainsi pas possible, pour l'instant, d'anticiper sur les mécanismes cellulaires responsables de la réversibilité de la désensibilisation à l'AVP. Il convient toutefois de rappeler que la désensibilisation persiste plusieurs heures après que la dDAVP ait été éliminée de l'organisme, et que c'est cette particularité qui nous a permis d'effectuer une étude *in vivo*. Le choix d'un traitement relativement prolongé est probablement à l'origine de cette persistance de la désensibilisation.

L'étude présentée ici est, à notre connaissance, la première où une désensibilisation de la branche large ascendante a été recherchée *in vivo*. D'autres auteurs avaient préalablement recherché une désensibilisation du rein à la vasopressine, mais seule la fonction des canaux collecteurs avait été étudiée / 33 / en effectuant des mesures d'osmolarité et de débit urinaire. Dans ces expériences, des doses massives d'arginine vasopressine (40 µg/100 g.jour) étaient administrées à de jeunes rats entre le 1er et le 7ème jours suivant la naissance, et la réponse antidiurétique à l'hormone était ensuite étudiée lorsque les animaux étaient âgés de plus de 40 jours. Le traitement par l'AVP durant la période néonatale diminuait de 30 % la réponse antidiurétique chez le rat de 40 jours. A l'âge de 90 jours, des mesures effectuées sur tranches de rein indiquaient une diminution des effets de l'AVP sur la formation d'AMP cyclique / 33 / et une diminution du nombre de sites de liaison de l'hormone / 34 /. La désensibilisation semble donc ici irréversible et, étant données les doses utilisées (il s'agit d'AVP et non de dDAVP), on peut s'interroger sur sa spécificité et les effets secondaires du traitement.

C O N C L U S I O N S



Cette étude montre que l'administration de doses pharmacologiques de dDAVP induit une désensibilisation du segment large ascendant du néphron de rat à la vasopressine. La désensibilisation obtenue est selon toute vraisemblance de nature homologue (ou spécifique de la vasopressine), les effets physiologiques de glucagon et de la calcitonine, qui agissent sur les mêmes cellules que la vasopressine dans le segment large ascendant, n'étant pas affectés. La spécificité de la désensibilisation est confirmée par sa réversibilité, pratiquement totale dès le cinquième jour suivant l'arrêt du traitement par la dDAVP. A la spécificité hormonale semble associée une spécificité segmentaire : les effets de la vasopressine sur le pouvoir de concentration du rein indiquent que son action sur le canal collecteur n'est pas, ou bien très faiblement, affectée.

Il convient de souligner que toutes ces observations ont été faites *in vivo*. Dans un premier temps, nous nous sommes donc attachés à définir les conditions expérimentales permettant de contrôler le mieux possible la concentration circulante de vasopressine pendant l'expérience, mais également celle des autres hormones (glucagon, calcitonine, PTH) connues pour induire les mêmes effets physiologiques dans le segment large ascendant. Il nous a semblé ainsi particulièrement approprié de travailler sur le rat Brattleboro, en diabète insipide permanent dû à l'absence d'ADH endogène. La concentration circulante de PTH, calcitonine et glucagon était abaissée au moyen d'une thyroparathyroïdectomie aiguë et de l'administration de somatostatine. Cette précaution était d'autant plus importante que nous voulions vérifier si la désensibilisation était homologue ou hétérologue.

La désensibilisation a été obtenue en administrant de la dDAVP, analogue synthétique qui se lie aux récepteurs rénaux couplés à l'adénylatecyclase mais est dépourvu d'effets vasculaires, d'autant plus indésirables ici que pour désensibiliser rapidement les animaux des doses pharmacolo-

giques de dDAVP (2 µg/jour durant 3 jours) ont été utilisées. Le problème le plus important à résoudre était de pouvoir contrôler l'activité antidiurétique plasmatique pendant l'expérience malgré l'administration préalable de dDAVP. Cette condition a pu être satisfaite en observant un délai de 2 jours entre la fin du traitement et le moment où les expériences sont réalisées. Un tel délai est en effet indispensable pour que l'urine excrétée par les animaux redevienne hypotonique. Le corollaire négatif de ce protocole expérimental est qu'il ne permet pas d'étudier la fonction rénale dans les heures qui suivent l'administration de dDAVP. Il ne nous est donc pas possible de dire, pour l'instant, si l'absence de désensibilisation marquée des canaux collecteurs observée ici est due à une cinétique de resensibilisation plus rapide que celle du segment large ascendant, et/ou au fait que des doses plus faibles suffisent pour désensibiliser ce dernier. La réponse à cette question, qui nous semble importante, ne peut de toute façon invalider la conclusion que les deux segments peuvent être désensibilisés indépendamment l'un de l'autre.

La signification physiologique de la similitude des effets de plusieurs hormones peptidiques dans le segment large ascendant est un problème actuel important en physiologie rénale. Un premier élément de réponse à cette question a pu être apporté par l'observation que le gradient cortico-papillaire de pression osmotique se dissipe rapidement et presque totalement lors de la suppression simultanée des quatre principales hormones peptidiques agissant sur ce segment / 63 /. La possibilité que des hormones telles que la calcitonine ou le glucagon puissent jouer un rôle dans le maintien du gradient de pression osmotique a ensuite été confirmée par la mise en évidence d'un rétablissement partiel de ce gradient lors de l'administration de l'une ou l'autre de ces hormones / 64 /. Nous voyons maintenant deux situations physiologiques où ces hormones pourraient effectivement intervenir dans le maintien du gradient. La première de ces situations est celle où la concentration plasmatique de vasopressine est insuffisante pour stimuler le segment large ascendant. Celui-ci présente en effet, *in vivo*, une sensibilité moindre à l'hormone que le canal collecteur / 20 /. La seconde situation

est celle décrite dans ce travail. La spécificité hormonale et segmentaire de la désensibilisation que nous avons observée indique en effet l'importance d'autres hormones que la vasopressine pour maintenir un taux élevé de réabsorption des électrolytes dans le segment large ascendant lorsque la concentration circulante de cette hormone s'accroît anormalement ou de façon prolongée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- / 1 / ABRAMOW M., BEAUWENS R. and COGAN E.  
Cellular events in vasopressin action.  
Kidney Int., 32 : 556-566, 1987.
- / 1a / AGUS Z.S. and GOLDFARB S.  
Renal regulation of calcium balance.  
In : The kidney, ed. by D.W. Seldin and G. Giebisch, Raven Press,  
New York, 1985, p. 1323-1336.
- / 2 / AMIEL C., BAILLY C. et FRIEDLANDER G.  
Modulation hormonale multiple des fonctions de la branche large  
ascendante de l'anse de Henle.  
In : Actualités Nephrol. Hôp. Necker. Flammarion Médecine-  
Sciences ed., p. 141-151, 1986.
- / 3 / BAILLY C., IMBERT-TEBOUL M., CHABARDES D., HUS A. CITHAREL,  
MONTEGUT M., CLIQUE A. and MOREL F.  
The distal nephron of rat kidney : a target site for glucagon.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77 : 3422-3424, 1980.
- / 4 / BAILLY C., ROINEL N. and AMIEL C.  
PTH like glucagon stimulation of  $Ca^{++}$  and  $Mg^{++}$  reabsorption in  
Henle's loop of the rat.  
Am. J. Physiol., 246 : F205-F212, 1984.
- / 5 / BAILLY C., ROINEL N. and AMIEL C.  
Stimulation by glucagon and PTH of Ca and Mg reabsorption in  
the superficial distal tubule of rat kidney.  
Pflügers Arch., 403 : 28-34, 1985.
- / 6 / BADDOURI K., BUTLEN D., IMBERT-TEBOUL M., LE BOUFFANT F.,  
MARCHETTI J., CHABARDES D. and MOREL F.  
Plasma antidiuretic hormone levels and kidney responsiveness  
to vasopressin in the Gerboa Jaculus orientalis.  
Gen. Comp. Endocr., 54 : 203-215, 1984.

- / 7 / BAXTER J.D. and FUNDER J.W.  
Hormone receptors.  
N. Engl. J. Med., 301 : 1149-1161, 1979.
- / 8 / BROADUS M., KAMINSKY E., NORTHCUTT R.C., HARDMAN J.G.,  
SUTHERLAND E.W. and LIDDLE G.W.  
Effects of glucagon on adenosine 3'-5' monophosphate and guanosine  
3'-5' monophosphate in human plasma and urine.  
J. Clin. Invest. 49 : 2237-2245, 1970.
- / 9 / BUTLEN D., BADDOURI K., RAJERISON R.M., GUILLON G., CANTAU B.  
and JARD S.  
Plasma antidiuretic hormone levels and liver vasopressine  
receptors in gerboa (jaculus orientalis) and rat.  
Gen. Comp. Endocr., 54 : 216-229, 1984.
- / 10 / BUTLEN D., MOREL F.  
Glucagon receptors along the nephron : (<sup>125</sup>I) glucagon binding  
in rat tubules.  
Pflügers Arch., 404 : 248-353, 1985.
- / 11 / BUTLEN D., GUILLOU G., RAJERISON R.M., JARD S., SAWYER W.H.  
and MANNING M.  
Structural requirements for activation of vasopressine sensi-  
tive adenylate cyclase, hormone binding, and antidiuretic action.  
Effects of highly potent analogues and competitive inhibitors.  
Mol. Pharmacol., 14 : 1006-1007, 1978.
- / 12 / BUTLEN D., JARD S.  
Renal handling of 3'-5' cyclic AMP in the rat. The possible role  
of luminal 3'-5' cyclic AMP in the tubular reabsorption of  
phosphate.  
Pflügers Arch., 331 : 172-190, 1972.
- / 13 / CATT K.J., HARWOOD J., AQUILERA G. and DUFAU M.L.  
Hormonal regulation of peptide receptors and target cell responses.  
Nature, London, 280 : 109-116, 1979.

- / 14 / CHEN P.S., TORIBARA T.Y. and WARNER H.  
Microdetermination of phosphorous.  
Anal. Chem., 28 : 1756-1758, 1956.
- / 15 / CULPEPPER R.M. and ANDREOLI T.E.  
Vasopressin and prostaglandin interaction in modulating NaCl  
absorption in mouse on TALH.  
Kidney Int., 21 : 270a (Abstract), 1982.
- / 16 / DOSS R.C., PERKINS J.P. and HARDEN T.K.  
Recovery of  $\beta$ -adrenergic receptors following long time exposure  
of astrocytoma cells to catecholamine.  
J. Biol. Chem., 256 : 12281-12286, 1981.
- / 17 / DI STEFANO A., ELALOUF J.M., GAREL J.M. and de ROUFFIGNAC C.  
Modulation by calcitonin of Mg and Ca urinary excretion in  
the rat.  
Kidney Int., 27 : 394-400, 1985.
- / 18 / ELALOUF J.M., CHABANE-SARI D., ROINEL N. and de ROUFFIGNAC C.  
NaCl and Ca delivery at the bend of rat deep nephrons  
decreases during antidiuresis.  
Am. J. Physiol., 252 : F1055-F1064, 1987.
- / 19 / ELALOUF J.M., CHABANE-SARI D. and de ROUFFIGNAC C.  
Additive effects of glucagon and vasopressin on renal Mg  
reabsorption and concentrating ability in the rat.  
Pflügers Arch., 407 : 566-571, 1986.
- / 20 / ELALOUF J.M., DI STEFANO A. and de ROUFFIGNAC C.  
Sensitivities of rat kidney thick ascending limbs and collecting  
ducts to vasopressin *in vivo*.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 2276-2280, 1986.
- / 21 / ELALOUF J.M., ROINEL N. and de ROUFFIGNAC C.  
Stimulation by human calcitonin of electrolyte transport in  
distal tubules of rat kidney.  
Pflügers Arch., 399 : 111-118, 1983.

- / 22 / ELALOUF J.M., ROINEL N. and de ROUFFIGNAC C.  
ADH-like effects of calcitonin on electrolyte transport by  
Henle's loop of rat kidney.  
Am. J. Physiol., 246 : F213-F220, 1984.
- / 23 / ELALOUF J.M., ROINEL N. and de ROUFFIGNAC C.  
Effects of antidiuretic hormone on electrolyte reabsorption and  
secretion in distal tubules of rat kidney.  
Pflügers Arch., 401 : 167-173, 1984.
- / 24 / ELALOUF J.M., CHABANE-SARI D., ROINEL N., de ROUFFIGNAC C.  
Desensitization of rat renal thick ascending limb cells to  
vasopressin.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (sous presse).
- / 25 / GELLAI G., SILVERSTEIN J.H., HWANG J.C., LA ROCHELLE F.T.  
and VALTIN H.  
Influence of vasopressin on renal hemodynamics in conscious  
Brattelboro rats.  
Am. J. Physiol., 246 : F819-F827, 1984.
- / 26 / GOTTSCHALK C.W. and MYLLE M.  
Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating  
mechanism : evidence for the countercurrent hypothesis.  
Am. J. Physiol., 196 : 927-936, 1959.
- / 27 / GRANTHAM J., BURG M.B.  
Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated  
collecting tubules.  
Am. J. Physiol., 211 : 255-259, 1966.
- / 28 / GREGER R.  
Chloride reabsorption in the rabbit cortical thick ascending  
limb of the loop of Henle. A sodium dependent process.  
Pflügers Arch., 390 : 38-43, 1981.

- / 29 / GREGER R. and SCHLATTER E.  
Properties of the lumen membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney.  
Pflügers Arch., 396 : 315-324, 1983.
- / 30 / GREGER R. and VELAZQUEZ H.  
The cortical thick ascending limb and early distal convoluted tubule in the urinary concentrating mechanism.  
Kidney Int., 31 : 590-596, 1987.
- / 31 / GUILLON G., BUTLEN D., CANTAU B., BARTH T. and JARD S.  
Kinetic and pharmacological characterization of vasopressin membrane receptors from human kidney medulla : Relation to adenylate cyclase activation.  
Eur. J. Pharmacol., 85 : 291-304, 1982.
- / 32 / HALL D.A. and VARNEY D.M.  
Effect of vasopressin on electrical potential difference and chloride transport in mouse medullary ascending limb of Henle's loop.  
J. Clin. Invest., 53 : 393-402, 1980.
- / 33 / HANDELMANN G., RUSSELL J.T., GAINER H., ZERBE R. and BAYORH M.  
Vasopressin administration to neonatal rats reduces antidiuretic response in adult kidney.  
Peptides, 4 : 827-832, 1983.
- / 34 / HANDELMANN G. and SAYSON S.C.  
Neonatal exposure to vasopressin decreases vasopressin binding sites in the adult kidney.  
Peptides, 5 : 1217-1219, 1984.
- / 35 / HANDLER J.S. and PRESTON A.S.  
Vasopressin elicited refractoriness of the response to vasopressin in toad urinary bladder.  
Am. J. Physiol., 240 : F551-F557, 1981.

- / 36 / HEBERT S.C., CULPEPPER M. and ANDREOLI T.E.  
NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs.  
I. Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl  
cotransport.  
Am. J. Physiol., 241 : F412-F431, 1981.
- / 37 / HEBERT S.C., REEVES W.B., MOLONY D.A. and ANDREOLI T.E.  
The medullary thick limb : function and modulation of the single  
effect multiplier.  
Kidney Int., 31 : 580-588, 1987.
- / 38 / HSUEH A.J.W., DUFAU M.L. and CATT K.J.  
Gonadotropin induced regulation of luteinizing receptors and  
desensitization of testicular 3'-5' cyclic AMP and testosterone.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 592-595, 1977.
- / 39 / IMBERT M., CHABARDES D., MONTEGUT M., CLIQUE A. and MOREL F.  
Vasopressin dependent adenylate cyclase in single segments of  
rabbit kidney tubule.  
Pflügers Arch., 357 : 173-186, 1975.
- / 40 / IMBERT M., CHABARDES D., MONTEGUT M. and MOREL F.  
Vasopressin-dependent adenylate cyclase activities in the rat  
kidney medulla : evidence for two separate sites of action.  
Endocrinology, 102 : 1254-1261, 1978.
- / 40a / JAMISON R.L. and KRIZ W.  
Urinary concentration mechanism : structure and function.  
Oxford University Press, 1982.
- / 41 / JOHNSTON P., LACY F.B. and JAMISON R.L.  
Effect of antidiuretic hormone-induced antidiuresis on water  
reabsorption by the superficial loop of Henle in Brattleboro  
rats.  
J. Lab. Clin. Med., 90 : 1004-1011, 1977.

- / 41a / KNOX F.G. and HARAMATI A.  
Renal regulation of phosphate excretion.  
In : The kidney, ed. by D.W. Seldin and G. Giebisch, Raven Press,  
New York, 1985 : p. 1381-1396.
- / 42 / KUNTZIGER H., AMIEL C., ROINEL N. and MOREL F.  
Effects of parathyroidectomy and cyclic AMP on renal transport  
of  $PO_4$ , Ca and Mg.  
Am. J. Physiol., 227 : 905-911, 1974.
- / 43 / LEFKOWITZ R.J., WESSELS M.R. and STUDEL J.M.  
Hormones, receptors and cyclic AMP. Their role in target cell  
refractoriness.  
Curr. Top. Cell. Res., 17 : 205-230, 1980.
- / 44 / LE GRIMELLE C., ROINEL N. and MOREL F.  
Simultaneous Mg, Ca, P, K, Na and Cl analysis in rat tubular fluid  
during perfusion of either insulin or ferrocyanide.  
Pflügers Arch., 340, n° 3 : 181-196, 1973.
- / 45 / LEVY M. and STARR N.L.  
The mechanism of glucagon-induced natriuresis in dogs.  
Kidney Int., 2, 76-84 (1972).
- / 46 / MANNING M., BALASPIRI L., MOEHRING J., HALDAR J. and SWAYER W.H.  
Synthesis and some pharmacological properties of deamino  
(4-threonine, 8-D arginine) vasopressin and deamino (8-D arginine)  
vasopressin, highly potent and specific antidiuretic peptides,  
and (8-D-arginine) vasopressin and deamino-arginine vasopressine.  
J. Med. Chi., 19 : 842-845, 1976.
- / 47 / MICKEY J.V., TATE R., MULLIKIN D. and LEFKOWITZ R.J.  
Regulation of adenylate cyclase coupled Beta adrenergic receptor  
Binding sites by Beta adrenergic catecholamines in vitro.  
Mol. Pharmacol., 12 : 409-419, 1975.

- / 48 / MOREL F.  
Sites of hormone action in the mammalian nephron.  
Am. J. Physiol., 240 : F159-F164, 1981.
- / 49 / MOREL F.  
Regulation of kidney functions by hormones : a new approach.  
Recent Progress in Hormone Research, 39 : 271-304, 1983.
- / 50 / MOREL F., CHABARDES D., IMBERT-TEBOUL M., LE BOUFFANT F.,  
HUS-CITHAREL F. and MONTEGUT M.  
Multiple hormonal control of adenylate cyclase in distal  
segments of the rat kidney.  
Kidney Int., 21 : 55-62, 1982.
- / 51 / MOREL F., IMBERT-TEBOUL M. and CHABARDES D.  
Distribution of hormone-dependent adenylate cyclase in the  
nephron and its physiological significance.  
Ann. Rev. Physiol., 43 : 569-581, 1981.
- / 52 / MOREL F. et ROINEL N.  
Application de la microsonde électronique à l'analyse élémentaire  
quantitative d'échantillons biologiques liquides d'un volume  
inférieur à  $10^{-9}$  l.  
J. Chim. Phys. Chim. Biol., 66 : 1984-1091, 1969.
- / 53 / MOREL F., IMBERT-TEBOUL M. and CHABARDES D.  
Receptors to vasopressin and other hormones in the mammalian  
kidney.  
Kidney Int., 31 : 512-520, 1987.
- / 54 / MOREL F., IMBERT-TEBOUL M. and CHABARDES D.  
Cyclic nucleotides and tubules function.  
Advances in Cyclic Nucleotides Research., 12 : 301-306, 1980.
- / 55 / MUKHERJEE C., CARON M.G. and LEFKOWITZ R.J.  
Regulation of adenylate cyclase coupled  $\beta$  adrenergic receptors  
By  $\beta$  adrenergic catecholamines.  
Endocrinology, 99 : 347-357, 1975.

- / 56 / POUJEOL P., TOUVAY C., ROINEL N. and de ROUFFIGNAC C.  
Stimulation of renal magnesium reabsorption by calcitonin in the rat.  
Am. J. Physiol., 239 : F524-F532, 1980.
- / 56a / QUAMME G.A. and DIRKS J.H.  
Magnesium : cellular and renal exchanges.  
In : The kidney, ed. by D.W. Seldin and G. Giebisch, Raven Press,  
New York, 1985, p. 1269-1280.
- / 57 / RAMSAY J.A. and BROWN R.H.  
Simplified apparatus and procedures for freezing point deter-  
minations upon small volumes of fluid.  
J. Sci. Instrum., 32 : 372-375, 1955.
- / 58 / RAJERISON R.M., BUTLEN D. and JARD S.  
Effects of *in vivo* treatment with vasopressin and analogues on renal  
adenylate cyclase responsiveness to vasopressin stimulation  
*in vitro*.  
Endocrinology, 101 : 1-12, 1977.
- / 59 / RAJERISON R.M., BUTLEN D. and JARD S.  
Ontogenic development of antidiuretic hormone receptors in Rat  
kidney : Comparaison of hormonal binding and adenylyate cyclase  
activation.  
Mol. Cell. Endocr., 4 : 271-285, 1976.
- / 60 / REFSNES M., SANDINES D. and CHRISTOFERSEN T.  
The relationship between  $\beta$  adrenoceptor regulation and  $\beta$  adrenergic  
responsiveness in hepatocytes. Studies on acquisition, desensiti-  
zation and resensitization of isoprotenerol-sensitive adenylyate  
cyclase in primary culture.  
Eur. J. Biochem., 163 : 457-466, 1987.
- / 61 / ROINEL N.  
Electron microprobe analysis of lyophilized  $10^{-10}$  L volume samples.  
J. Microscr., 22 : 261-268, 1975.

- / 62 / ROUFFIGNAC (de) C., CORMAN B. and ROINEL N.  
Stimulation by antidiuretic hormone of electrolyte tubular reabsorption in rat kidney.  
Am. J. Physiol., 244 : F156-F164, 1983.
- / 63 / ROUFFIGNAC (de) C., ELALOUF J.M.  
Effects of calcitonin on the renal concentrating mechanism.  
Am. J. Physiol., 245 : F506-F511, 1983.
- / 64 / ROUFFIGNAC (de) C., ELALOUF J.M. and ROINEL N.  
Physiological control of the urinary concentrating mechanism by peptide hormones.  
Kidney Int., 31 : 611-620, 1987.
- / 65 / ROUFFIGNAC (de) C. and ELALOUF J.M.  
Effects of vasopressin on the nephron function of the hormone deprived rat.  
In : Proceedings of the Second International Conference on Vasopressin. Ed. by Cowley (à paraître).
- / 66 / ROY C., BARTH T. and JARD S.  
Vasopressin-sensitive kidney adenylate cyclase. Structural requirements for attachment to the receptor and enzyme activation : studies with vasopressin analogues.  
J. Bio. Chem., 250 : 3149-3156, 1975.
- / 67 / SASAKI S. and IMAI M.  
Effects of vasopressin on water and NaCl transport across the *in vitro* perfused thick ascending limb of Henle's loop of mouse, rat and rabbit kidney.  
Pflügers Arch., 383 : 215-221, 1980.
- / 68 / SCHNERMANN J., VALTIN H., THURAU K., NAGEL W., HORSTER M., FISCHBACH H., WAHL M. and LIEBAU G.  
Micropuncture studies on the influence of antidiuretic hormone on tubular fluid reabsorption in rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus.  
Pflügers Arch., 308 : 103-118, 1969.

- / 69 / SCHWARTZ D.  
Méthode statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.  
Editions Médicales Flammarion, 1963.
- / 70 / SHAREGHI G.R. and AGUS Z.S.  
Magnesium transport in the cortical thick ascending limb of  
Henle's loop of the rabbit.  
J. Clin. Invest., 69 : 759-769, 1982.
- / 71 / SIBLEY D.R. and LEFKOWITZ R.J.  
Molecular mechanisms of receptor desensitization using the  
 $\beta$ -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model.  
Nature, 317 : 124-129, 1985.
- / 72 / SU Y.-F., HARDEN T.K. and PERKINS J.P.  
Catecholamine-specific densensitization of adenylate cyclase.  
J. Biol. Chem., 255 : 7410-7419, 1980.
- / 73 / SUKI W.N. and ROUSE D.  
Hormonal regulation of calcium transport in thick ascending  
limb renal tubules.  
Am. J. Physiol., 241 : F171-F174, 1981.
- / 74 / SUKI W.N., ROUSE D., NG R.C.K. and KOKKO J.P.  
Calcium transport in the thick ascending limb of Henle.  
Heterogeneity of function in the medullary and cortical segments.  
J. Clin. Invest., 66 : 1004-1009, 1980.
- / 75 / TORIKAI S., WANG M.S., KLEIN K.L. and KUROKAWA K.  
Adenylate cyclase and cell cyclic AMP of rat cortical thick  
ascending limb of Henle.  
Kidney Int., 20 : 649-654, 1981.
- / 76 / TRINH-TRANG-TAN M.M., DIAZ M., GRUNFELD J.P. and BANKIR L.  
ADH-dependent nephron heterogeneity in rats with hereditary  
hypothalamic diabetes insipidus.  
Am. J. Physiol., 240 : F372-380, 1981.

- / 77 / VALTIN H., SCHROEDER H.A., BENICHKE K. and SOKOL W.  
Familial hypothalamic diabets insipidus in rats.  
Nature, 196 : 1109-1110, 1962.
- / 78 / VAVRA K., MACHOVA A., HOLOCEK V., CORT J.H., ZAORAL and SORM F.  
Effect of a synthetic analogue of vasopressin in animals and  
in patients with diabetes insipidus.  
Lancet, 1 : 948-952, 1968.
- / 79 / WITTNER M. and DI STEFANO A.  
Comparative effects of ADH and Glugagon on NaCl reabsorption in  
isolated perfused medullary thick ascending limbs of mouse kidney ;  
effect of ADH on relative tight junction permselectivity.  
Proceedings of the Xth International Congress of Nephrology,  
London, 26-31 July 1987.
- / 80 / WORK J., GALLA J., BOOKER B., SCHAFER J.A. and LUKE R.  
Effect of ADH on chloride reabsorption in the loop of Henle of  
the Brattleboro rat.  
Am. J. Physiol., 249 : F696-F703, 1985.



## RÉSUMÉ

Cette étude, effectuée *in vivo* chez le rat, montre que l'administration de doses pharmacologiques de dDAVP, un analogue synthétique de la vasopressine, induit une désensibilisation du segment large ascendant du néphron à la vasopressine. Cette désensibilisation est de nature homologue, les effets physiologiques du glucagon et de la calcitonine, qui agissent sur les mêmes cellules que la vasopressine dans le segment large ascendant, n'étant pas affectés. La spécificité de la désensibilisation est confirmée par sa réversibilité, pratiquement totale dès le cinquième jour suivant l'arrêt du traitement par la dDAVP. A la spécificité hormonale semble associée une spécificité segmentaire : les effets de la vasopressine sur le pouvoir de concentration du rein indiquent que son action sur le canal collecteur n'est pas, ou bien très faiblement affectée. La spécificité hormonale et segmentaire de la désensibilisation induite par la dDAVP souligne l'importance de l'action physiologique d'hormones telles que le glucagon et la calcitonine sur le segment large ascendant de l'anse de Henle. Ces hormones pourraient en effet contribuer à maintenir un taux élevé de réabsorption des électrolytes dans le segment large ascendant lorsque celui-ci a en partie perdu la capacité d'être stimulé par la vasopressine.

## MOTS CLÉS :

Hormone antidiurétique  
Glucagon  
Calcitonine  
Adényl-cyclase  
Désensibilisation