

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE / PHARMACODYNAMIQUE
DE L'OCYTOCINE CHEZ LE RAT ANESTHÉSIÉ

par

VALÉRIE MORIN

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option biomédecine

Août 2007

© Valérie Morin, 2007



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE / PHARMACODYNAMIQUE
DE L'OCYTOCINE CHEZ LE RAT ANESTHÉSIÉ**

Présenté par :

VALÉRIE MORIN

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr JACQUES LUSSIER, Président-rapporteur

Dr ÉRIC TRONCY, Directeur de recherche

Dre JOLANTA GUTKOWSKA, Codirectrice

Dr JÉRÔME DEL CASTILLO, Codirecteur

Dr. DENIS VAILLANCOURT, Membre du jury

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

En raison d'un potentiel récemment suggéré de l'ocytocine (OT) en cardiorégénération, l'établissement de son profil pharmacocinétique (PK) en fonction de la dose s'avère une nécessité pharmacologique. L'objectif de ce travail était de documenter la relation dose-concentration d'OT lorsqu'administrée en bolus intraveineux (*i.v.*). Notre hypothèse est que l'OT devrait présenter une PK non linéaire, ou dose-dépendante, en raison d'effets pharmacodynamiques pouvant affecter sa propre clairance. Les résultats obtenus sur la clairance totale (CL_t), les volumes de distribution (V_c , V_p et V_{ss}) et la demi-vie d'élimination ($t_{1/2\beta}$) appuient cette hypothèse : CL_t et V_c diminuent de 1,5 à 3 fois à partir d'une dose de $1000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ *versus* les doses plus faibles testées; $t_{1/2\beta}$ est augmenté en conséquence. L'administration d'OT par bolus *i.v.* tend vers une excrétion accrue de Na^+ et de K^+ ($p = 0,04$) et du volume d'urine ($p < 0,005$), atteignant une valeur maximale à la dose de $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT, puis un arrêt brutal de ces effets est observé aux doses subséquentes ($5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT et plus). Ceci suggère une diminution dans la filtration glomérulaire concomitante avec la diminution de la CL_t et l'augmentation de la $t_{1/2\beta}$ obtenus dans l'étude PK.

Ces résultats proposent que les procédés d'élimination de l'OT sont plus rapides et efficaces aux faibles doses, qu'il se produit une possible saturation des récepteurs au niveau vasculaire à partir d'une dose de $1000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT et qu'en plus, les effets de l'OT sur la fonction rénale à haute dose ($5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT et plus) affectent l'élimination de l'OT, notamment par diminution de la filtration glomérulaire.

Mots clés

Ocytocine, radioimmunos dosage, pharmacocinétique, pharmacodynamique, natriurèse, diurèse, kaliurèse, rat, modélisation compartimentale.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS "ABSTRACT"

Because of a potential recently shown of oxytocin (OT) in cardioregeneration, the establishment of its pharmacokinetic profile (PK) according to the amount proves to be a pharmacological need. The objective of this work was to document the relation amount-concentration of OT when managed in intravenous bolus (*i.v.*). Our assumption is that the OT should present a nonlinear PK, or amount-dependent, because of pharmacodynamic effects being able to affect its own clearance. The results obtained on the total clearance (CL_t), volumes of distribution (V_c , V_p and V_{ss}) and the half-life of elimination ($t_{1/2\beta}$) support this assumption: CL_t and V_c decrease by 1,5 to 3 times starting from an amount of 1000 ng·kg⁻¹ OT versus the weaker amounts tested; $t_{1/2\beta}$ is increased consequently. The administration of OT by bolus *i.v.* tends towards an increased excretion of Na⁺ and K⁺ ($p = 0,04$) and volume of urine ($p < 0,005$), reaching a maximum value with the amount of 3000 ng·kg⁻¹ OT, then a brutal stop of these effects is observed with the subsequent amounts (5000 ng·kg⁻¹ OT and more). This suggests a reduction in glomerular filtration concomittante with the reduction in the CL_t and the increase in $t_{1/2\beta}$ obtained in the PK study.

These results propose that the processes of elimination of the OT are faster and effective with low dose, that it occurs a possible saturation of the receptors at the vascular level starting from an amount of 1000 ng·kg⁻¹ OT and that moreover, effects of the OT on the renal function with high amount (5000 ng·kg⁻¹ OT and more) affect the elimination of the OT particularly by reducing the glomerular filtration rate.

Key words

Oxytocin, radioimmunoassay, pharmacokinetics, pharmacodynamics, natriuresis, diuresis, kaliuresis, rat, compartmental modelisation.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....	iii
Mots clés.....	iii
RÉSUMÉ EN ANGLAIS " <i>ABSTRACT</i> "	iv
Key words.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
REMERCIEMENTS.....	xxi
CHAPITRE I	1
1.0. INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE II	3
2.0. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	3
2.1. Découverte de l'ocytocine	3
2.2. Structure de l'ocytocine.....	3
2.3. Effets de l'ocytocine sur les organes reproducteurs.....	4
▪ 2.3.1. Contractions utérines et éjection du lait.....	4

▪ 2.3.2. Fonctions reproductrices mâles	4
2.4. Effets de l'ocytocine sur le comportement	5
▪ 2.4.1. Influence sur le comportement sexuel.....	5
▪ 2.4.2. Interactions sociales et attachement maternel.....	5
▪ 2.4.3. Développement de la confiance sociale	5
2.5. Autres effets de l'ocytocine	6
2.6. Régulation de la production, de la sécrétion et de la dégradation de l'ocytocine.....	6
▪ 2.6.1. Gène de l'ocytocine.....	6
▪ 2.6.2. Biosynthèse de l'ocytocine.....	7
▪ 2.6.3. Régulation centrale de la production et de la sécrétion d'ocytocine	8
▪ 2.6.4. Dégradation de l'ocytocine.....	9
2.7. Récepteur de l'ocytocine	10
▪ 2.7.1. Génétique du récepteur.....	10
▪ 2.7.2. Distribution du récepteur.....	10
▪ 2.7.3. Interaction du récepteur avec l'ocytocine.....	11
▪ 2.7.4. Interaction du récepteur à l'ocytocine avec un peptide apparenté; la vasopressine	12

▪ 2.7.5. Sélectivité et affinité des récepteurs pour l'ocytocine et la vasopressine	13
▪ 2.7.6. Mécanisme de la transduction du signal.....	14
▪ 2.7.7. Mécanisme de désensibilisation du récepteur de l'ocytocine....	15
2.8. Pharmacodynamie de l'ocytocine sur les fonctions rénales	16
▪ 2.8.1. Régulation de l'homéostasie hydrique	16
▪ 2.8.2. Régulation de la relâche des hormones neurohypophysaires dans le maintien de l'homéostasie hydro électrolytique	17
▪ 2.8.3. Effets de l'ocytocine sur la natriurèse, la kaliurèse, le taux de filtration glomérulaire et la sécrétion de rénine, au niveau rénal	19
▪ 2.8.4. Facteurs affectant la réponse natriurétique de l'ocytocine	21
▪ 2.8.5. Mécanisme d'action de l'induction de la natriurèse par l'ocytocine	21
▪ 2.8.6. Effets de l'ocytocine sur la relâche du facteur atrial natriurétique	22
▪ 2.8.7. Mécanisme de l'anti-diurèse causée par la vasopressine	23
▪ 2.8.8. Effets diurétiques / anti-diurétiques répertoriés de l'ocytocine	25
2.9. Pharmacodynamie de l'ocytocine sur la fonction cardiovasculaire	28
▪ 2.9.1. Effets <i>ex vivo</i> de l'ocytocine sur le tonus vasculaire.....	28
• 2.9.1.a. Études sur la vascularisation isolée.....	28

• 2.9.1.b. Études sur cœur isolé.....	29
▪ 2.9.2. Effets <i>in vivo</i> de l'ocytocine sur la fonction cardiovasculaire...	31
▪ 2.9.3. Variation des effets de l'ocytocine sur la pression artérielle systémique	33
▪ 2.9.5. Effets de l'ocytocine sur la différenciation cellulaire des cardiomyocytes et sur l'organogenèse	36
2.10. Pharmacocinétique de l'ocytocine.....	37
▪ 2.10.1. Utilisation et administration chez l'humain.....	37
▪ 2.10.2. Notions élémentaires de pharmacocinétique	38
• 2.10.2a. Absorption	38
• 2.10.2b. Distribution.....	39
• 2.10.2c. Métabolisme et élimination	40
▪ 2.10.3. Modélisation pharmacocinétique	41
▪ 2.10.4. Paramètres pharmacocinétiques.....	43
• 2.10.4a. La clairance totale (CL_t).....	43
• 2.10.4b. Le volume de distribution apparent (V)	44
• 2.10.4c. La demi-vie ($t_{1/2}(\lambda_z)$).....	45
▪ 2.10.7. Propriétés pharmacocinétiques de l'ocytocine chez l'humain.	45
▪ 2.10.8. Propriétés pharmacocinétiques de l'ocytocine chez l'animal..	47

2.11. Énoncé du problème, hypothèses et objectifs de recherche.....	49
CHAPITRE III.....	51
3.0. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	51
CHAPITRE IV.....	61
4.0. RÉSULTATS.....	61
4.1. Résultats de l'étude pharmacocinétique de l'ocytocine – Publication soumise auprès de Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences.....	61
4.2. Résultats de l'étude pharmacodynamique de l'ocytocine sur la fonction rénale – Sont présentés dans l'Annexe 1 (page xxiv).....	61
CHAPITRE V.....	86
5.0. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	86
5.1. Choix du modèle expérimental.....	86
5.2. Non-linéarité de l'ocytocine.....	88
▪ 5.2.1. Modèle compartimental de l'ocytocine.....	88
▪ 5.2.2. Superposition des courbes des concentrations plasmatiques d'ocytocine en fonction du temps.....	89
▪ 5.2.3. Clairance systémique de l'ocytocine.....	90
▪ 5.2.4. Volumes de distribution de l'ocytocine.....	91
▪ 5.2.5. Clairance de distribution de l'ocytocine.....	93

▪ 5.2.6. Demi-vie d'élimination de l'ocytocine	94
▪ 5.2.7. Conclusion sur la non-linéarité de l'ocytocine	95
5.3. Considérations à prendre dans la mise au point du protocole expérimental PK	96
▪ 5.3.1. Limitation technique due au volume sanguin	97
▪ 5.3.2. Choix des doses à tester	98
▪ 5.3.3. Sélection des groupes	98
5.4. Effets pharmacodynamiques de l'ocytocine sur la natriurèse, la kaliurèse et la diurèse	99
▪ 5.4.1. Évaluation du taux de filtration glomérulaire	100
▪ 5.4.2. Conclusion sur les effets observés de l'ocytocine sur la natriurèse, la kaliurèse et la diurèse	101
5.5. Considérations à prendre dans la mise au point du protocole de la natriurèse, la kaliurèse et la diurèse	102
5.6. Perspectives	102
CHAPITRE VI	104
6.0. CONCLUSION GÉNÉRALE	104
CHAPITRE VII	105
7.0. SOURCES DOCUMENTAIRES	105
Annexe I –	xxiv

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Similarités entre les structures primaires de l'ocytocine et de la vasopressine	13
Tableau II. Effets observés sur la natriurèse et la diurèse chez diverses espèces animales suite à différents modes d'administration d'ocytocine.	27
Tableau III. Effets cardiovasculaires observés chez diverses espèces animales suite à différents modes et dosages d'administration d'ocytocine	35
Tableau IV. Les concentrations basales d'ocytocine endogène chez l'humain.	46
Tableau V. Paramètres pharmacocinétiques de l'ocytocine chez l'humain.	46
Tableau VI. Clairance systémique de l'ocytocine chez l'homme et la femme.	47
Tableau VII. Temps de demi-vie plasmatique de l'ocytocine chez diverses espèces animales.	47
Tableau VIII. Groupes de rats anesthésiés lors de l'étude PK/PD	56
Tableau IX. Détails des groupes de rat et résultats de l'étude PD rénale	xxiv

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Principales causes de décès dans le monde en 2005	1
Figure 2. Principales causes de décès au Canada en 2005	2
Figure 3. Structure primaire de l'ocytocine.	3
Figure 4. Gène de l'ocytocine-neurophysine	7
Figure 5. Modèle du récepteur de l'OT en interaction avec son ligand OT.....	12
Figure 6. Expression des aquaporines au niveau de la cellule tubulaire suite à la liaison de la vasopressine à son récepteur.	24
Figure 7. Modèle pharmacocinétique ouvert à deux compartiments	42
Figure 8. Courbe semi-logarithmique des concentrations plasmatiques en fonction du temps d'un modèle ouvert à deux compartiments divisée en deux parties ; la phase de distribution (α) et la phase d'élimination (β).	43
Figure 9. Pesée et identification des rats dans les locaux de LAB Research inc...52	
Figure 10. Installation de cathéter de type papillon (25G) dans la veine caudale .52	
Figure 11. Pompe à infusion de type AS50 pour le maintien de la fluidothérapie 53	
Figure 12. Étude PK/PD chez le rat anesthésié	54
Figure 13. Modèles pharmacocinétiques à un et à deux compartiments.....	57
Figure 14. Diurèse observée suite à l'administration de différentes doses <i>i.v.</i> d'ocytocine.....	xxv
Figure 15. Natriurèse et kaliurèse suite à l'administration de différentes doses <i>i.v.</i> d'ocytocine.....	xxvi

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%	Pourcent
°C	Degrés Celcius
¹²⁵ I-Na	Iode 125 radioactif sodique
ADME	Absorption / Distribution / Métabolisme / Élimination
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine-3', 5'-monophosphate cyclique
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i> – Facteur (Peptide) atrial natriurétique
ARN	Acide ribonucléique
Asn	Asparagine
AUC	<i>Area under the curve</i> – Surface sous la courbe de la concentration plasmatique du médicament en fonction du temps
AV3V	<i>Antero-ventral portion of the third ventricle</i> – Région ventrale antérieure du troisième ventricule
AVP	[Arginine ⁸]-Vasopressine ou Vasopressine
B _{max}	Liaison maximale à saturation
bpm	Battements par minute
Ca ²⁺	Ion calcium
cc	Centimètre cube

CH ₃ CN	Acétonitrile
CL	Clairance systémique
CL _D	Clairance de distribution
CL _h	Clairance métabolique hépatique
CL _t	Clairance totale
cm	Centimètre
C _p	Concentration plasmatique
cpm	Coups par minute
CRI	<i>Constant rate infusion</i> – Perfusion à débit constant
CV	Coefficient de variation
Cys	Cystéine
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
<i>die</i>	Une fois par jour
DPS	Désintégrations par seconde
EC ₅₀	Puissance ou affinité relative
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> – Acide éthylène diamine tétra-acétique

F	Biodisponibilité
g	Gramme
GDP	Guanosine diphosphate
Gln	Glutamine
Gly	Glycine
GMPc	Guanosine-3', 5'-monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> – Chromatographie liquide à haute performance
hr	Heure
<i>i.c.</i>	Intra cisternal
<i>i.c.v.</i>	Intra cérébroventriculaire
<i>i.m.</i>	Intramusculaire
<i>i.t.</i>	Intrathécal
<i>i.v.</i>	Intraveineux
Ile	Isoleucine
IP ₃	Inositol-1, 4, 5-triphosphate
K	Constante d'élimination

K^+	Ion potassium
k_{10}	Constante d'élimination du système à partir du compartiment central
k_{12}	Constante de transfert ou de distribution du compartiment central vers le compartiment périphérique
k_{21}	Constante de transfert ou de distribution du compartiment périphérique vers le compartiment central
Kb	Kilobase
K_d	Constante de dissociation
kg	Kilogramme
L	Litre
λ_z	Pente terminale d'élimination d'un médicament
Leu	Leucine
$\ln(2)$	Logarithme népérien en base 2
L-NAME	<i>N</i> (ω)-nitro-L-arginine methyl ester
M	Molaire
MAP kinase	<i>Mitogen activated protein kinase</i> – Protéine kinase activée par les mitogènes
Met	Méthionine

μCi	Microcurie
μg	Microgramme
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mmHg	Millimètres de mercure
mol	Mole
mU	Milli-unité internationale
N	Effectifs
Na^+	Ion sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaPO_4	Phosphate de potassium monobasique
ng	Nanogramme
NO	Monoxyde d'azote
OT	Ocytocine
P	Probabilité d'obtenir la statistique quand l'hypothèse nulle est vraie
PA	Principe actif
PAM	Pression artérielle moyenne

PAS	Pression artérielle systolique
P19	Lignée cellulaire de cellules souches embryonnaires
PD	Pharmacodynamie (nom) - Pharmacodynamique (adjectif)
pg	Picogramme
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandine F _{2α}
pH	Logarithme en base 10 de la concentration en ion hydrogène
PK	<i>Pharmacokinetics</i> – Pharmacocinétique
PK/PD	<i>Pharmacokinetics/Pharmacodynamics</i> Pharmacocinétique-pharmacodynamie (que)
PKA	Protéine kinase AMPcyclique-dépendante
PLC	Phospholipase C
pmol	Picomole
PMSF	Para méthyl sulfafluorure
Pro	Proline
PVN	<i>Paraventricularis nucleus</i> – Noyau paraventriculaire
R-AVP	Récepteur de la vasopressine
RCPG	Récepteur couplé à une protéine G

RIA	<i>Radioimmunoassay</i> – Dosage radio-immunologique
R-OT	Récepteur de l'ocytocine
rpm	Rotations par minute
s.c.	Sous-cutané
S.E.M.	<i>Standard error of the mean</i> – Erreur-type
Sca-1	<i>Stem cell antigen-1</i> (marqueur cellulaire associé au myoremodelage)
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i> - Rat spontanément hypertendu
SON	<i>Supraoptical nucleus</i> – Noyau supraoptique
$t_{1/2}(\lambda_z)$	Demi-vie d'élimination
$t_{1/2\alpha}$	Demie-vie de la phase de distribution
$t_{1/2\beta}$	Demi-vie d'élimination
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> – acide trifluoroacétique
TFG	Taux de filtration glomérulaire
Tyr	Tyrosine
UI	Unité Internationale
V	Volume de distribution apparent
V_1	Volume de distribution du compartiment central

V_C	Volume de distribution du compartiment central
V_2	Volume de distribution du compartiment périphérique
V_P	Volume de distribution du compartiment périphérique
V_{ss}	Volume de distribution apparent à l'état d'équilibre

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers Dr. Éric TRONCY pour avoir accepté d'être mon directeur de recherche et de m'avoir guidée durant ces années. Son dynamisme exemplaire et son optimisme contagieux ont été d'un grand support tout au long de mon parcours. La qualité de son encadrement ainsi que son leadership ont été des facteurs clés dans la réalisation et l'aboutissement de ce projet. Il a su faire émerger les forces individuelles de chacun et les faire valoir et lorsque rassemblées en une équipe multidisciplinaire, la symbiose n'a pu qu'être réalisée. J'admire sa façon de coordonner, c'est digne des plus grands *maestros*.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance envers Dr. Jérôme del CASTILLO, mon co-directeur de recherche, pour avoir ardemment participé à ma formation en recherche et en pharmacocinétique. Sa patience exemplaire et son énergie consacrée envers moi dans le partage de ses connaissances me sont vraiment précieuses. Ce chercheur passionné et rigoureux m'a été d'une grande aide à toutes les nombreuses fois où j'ai nécessité l'appui de ses compétences, où j'ai toujours été accueillie avec bonne humeur et encouragements. Pour moi, il a été un pôle qui a contribué à l'avancement de ce projet. J'ai apprécié les discussions entamées sur la problématique de la résistance aux antibiotiques en pratique de la médecine des populations porcines. Il a su me communiquer et me transmettre un intérêt pour la pharmacocinétique.

Sincères remerciements à Dre. Jolanta GUTKOWSKA du Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu du CHUM, ma co-directrice de recherche, pour avoir accepté ma candidature et avoir contribué à la réalisation de mon projet. Grâce à Dre. Gutkowska, une Équipe en émergence fut créée et a obtenu du financement accordé par les Instituts de Recherche en Santé du Canada ainsi que par la Fondation des maladies du cœur du Canada. Elle m'a accueillie chaleureusement dans son laboratoire et m'a assurée un encadrement dans l'analyse de mes échantillons par les techniques et expertises développées dans son laboratoire. Elle m'a bien sûr accordé l'utilisation des équipements et produits chimiques de son laboratoire, ainsi qu'un entourage formidable assuré par les membres de son

équipe. J'ai vraiment apprécié les interactions eues avec Dre. Gutkowska ainsi que l'Équipe en émergence lors de nos vidéoconférences et réunions de groupes, ce fut pour moi un enseignement précieux en communication et un éveil scientifique quant à l'étendue globale du projet.

Je remercie sincèrement Dr. Simon AUTHIER, mon collègue inscrit au Ph.D. et vétérinaire en chef à l'entreprise LAB Research Inc., pour avoir contribué à toutes les phases expérimentales animales du projet et pour avoir apporté son expertise scientifique à la cause. Il a été la ressource clé dans l'organisation et le bon déroulement de nos fins de semaine chirurgicales. Son énergie et son optimisme sont remarquablement exemplaires; son attitude me sert de référence et m'inspirera dans chacune de mes épreuves. Il n'y a pas de problème, que des solutions.

Je remercie chaleureusement Dr. Marek JANKOWSKI et Dre. Suhayla MUKKADAM-DAHER pour leur soutien scientifique et leur encadrement lors de mes visites au Laboratoire de biochimie cardiovasculaire du CHUM, principalement lorsque j'effectuais mes analyses d'échantillons au laboratoire. J'ai vraiment apprécié qu'ils m'aient consacré du temps à répondre à mes questions et à s'intéresser à mes manipulations, j'en suis très reconnaissante.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude envers Norma YBARRA, ma collègue à la Maîtrise, pour son aide grandement appréciée en tout point ainsi que lors des phases expérimentales de mon projet, mais également pour son amitié qui m'est très chère. Nous avons commencé en même temps, en venant de deux mondes différents, mais nous avons partagé une même réalité et j'ai appris beaucoup de cette expérience humaine enrichie d'altruisme, et même quelques mots en espagnol. Mucho gracias !

Je remercie chaleureusement Colombe OTIS, ma collègue à la Maîtrise, pour son aide vraiment appréciée lors des analyses pharmacocinétiques, son amitié et sa disponibilité, surtout lors des soirées consacrées à ces analyses. Son sourire et sa bonne humeur agrémentaient le travail. Je tiens également à la féliciter pour sa belle petite fille, Florence qu'elle a donné naissance en décembre 2006.

Je tiens à remercier Dr. Guy BEAUCHAMP, Ph.D., pour ses compétences et pour m'avoir apporté un support précieux lors de certaines analyses statistiques.

Je remercie sincèrement Dre. Mylène CÔTÉ, Ph.D., pour son support grandement apprécié, pour le partage de ses compétences et connaissances scientifiques, et pour le temps qu'elle m'a consacrée lors de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie chaleureusement tous les gens qui m'ont entourée et partagé amitié et bons moments lors de mon passage à la Faculté de médecine vétérinaire et je cite ; Pascale Riolland et sa famille, Dominique Gauvin, Sylvain Bichot, Luc Héroux, Johanna Kaartinen et Dave Bernier.

Je tiens à remercier tous les professeurs qui m'ont enseigné au deuxième cycle et tous les membres du personnel de la Faculté de médecine vétérinaire avec qui j'ai pu interagir que ce soit au secrétariat, à l'animalerie, à l'hôpital des petits animaux, à la ferme Frontenac, à la bibliothèque, l'association étudiante, les gardiens de sécurité ou personnel d'entretien. Merci à tous.

Je remercie chaleureusement les gens qui m'ont entourée au Laboratoire de biochimie cardiovasculaire du CHUM et qui ont contribué à agrémentez considérablement mes déplacements à Montréal. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler en votre compagnie et je vous remercie pour votre soutien et je garde un merveilleux souvenir de vous : Valérie, Pierre-Alexandre (que j'ai surnommé J-P pour le taquiner), Wang, Ahmed, Safa, Kiti, Tao.

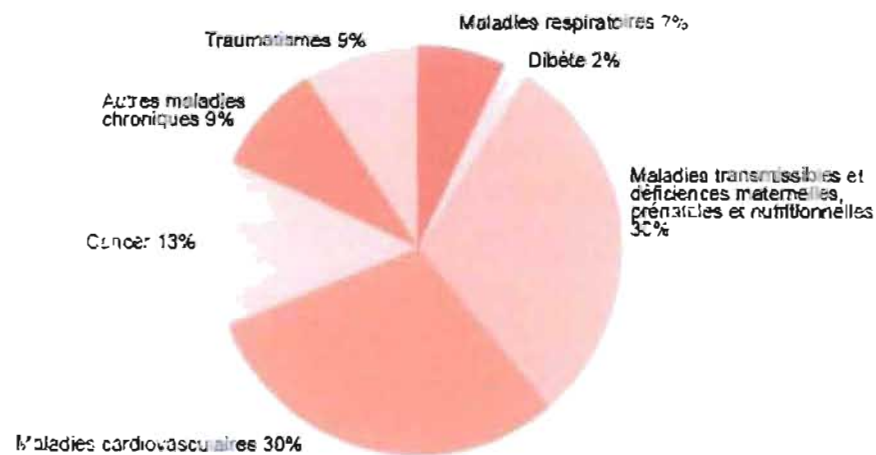
CHAPITRE I

1.0. INTRODUCTION

L'Organisation mondiale de la santé estime que 60 % de tous les décès dans le monde sont causés par la morbidité chronique. Il y a 58 millions de gens qui auront trouvé la mort en 2005, dont 35 millions à cause d'affections chroniques, le plus souvent du fait de maladies transmissibles, d'affections cardiovasculaires ou du cancer (Figure 1). À l'exception des maladies transmissibles, les tendances observées au Canada sont à peu près les mêmes (Figure 2) (OMS, 2005). Ainsi, les maladies cardiovasculaires représentent une des plus grandes sources de décès au Canada, la cause majeure étant la défaillance myocardique post-ischémique.

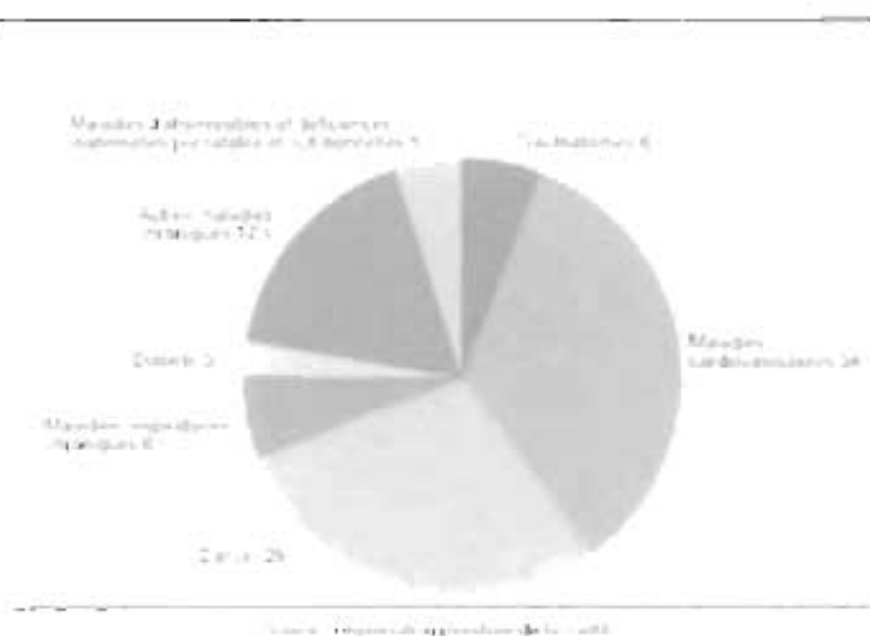
De récentes découvertes, réalisées avec l'hormone neurohypophysaire ocytocine (OT) sur des cellules souches, indiquent un réel intérêt thérapeutique à son utilisation pour des fins de régénération myocardique. Le laboratoire du Dr. Troncy, en collaboration avec Dre. Gutkowska ainsi qu'une équipe multidisciplinaire, ont créé une *Équipe en Émergence* visant à étudier les effets cardiorégénérateurs de l'OT lors d'infarctus du myocarde. Ces travaux de recherche sont rendus possibles grâce au financement accordé par les Instituts de Recherche en Santé du Canada ainsi que par la Fondation des maladies du cœur du Canada.

Figure 1. Principales causes de décès dans le monde en 2005



Source : Organisation mondiale de la santé

Figure 2. Principales causes de décès au Canada en 2005



Légende explicative : le lecteur notera que les maladies cardiovasculaires forment la catégorie de maladies la plus prévalente durant la période d'étude (OMS, 2005).

Mon projet de recherche, portant sur l'étude pharmacocinétique (PK) et pharmacodynamique (PD) de l'ocytocine chez le rat mâle anesthésié, a pris naissance suite à la nécessité d'obtenir une caractérisation PK/PD approfondie de l'ocytocine chez diverses espèces animales, afin de permettre l'établissement ultérieur d'un régime posologique éventuel chez l'humain en thérapie post-ischémique.

Afin de mieux vous situer, la revue de la littérature présentée dans ce mémoire fera un bref rappel des effets pharmacologiques "traditionnels" de l'OT sur le système reproducteur et l'allaitement, mais vise principalement à faire ressortir les aspects pharmacologiques "non traditionnels" de l'OT, soit son implication dans la régulation des fonctions rénale et cardiovasculaire. Un accent particulier sera mis sur les propriétés pharmacocinétiques, sujet principal de mes travaux de maîtrise.

CHAPITRE II

2.0. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1. Découverte de l'ocytocine

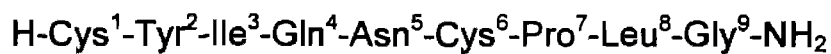
En 1895, Oliver et Schafer ont observé que l'injection d'extraits de glande pituitaire, c'est-à-dire l'hypophyse, provoquait des contractions utérines, des contractions de muscles lisses et causait l'éjection de lait en période de lactation (Oliver, G. & Schafer, E.A., 1895). L'ocytocine (OT) est donc connue depuis longtemps pour ses propriétés utérotoniques (Dale, H.H., 1906) et pour sa capacité à stimuler l'éjection du lait (Ott, J. & Scott, J.C., 1910), elle tire son nom du grec : *okus* = rapide.; *tokos* = accouchement.

En 1953, Victor Du Vigneaud synthétisa l'OT, première hormone polypeptidique à être synthétisée (Du Vigneaud, V., 1953). Cette réalisation lui a valu le Prix Nobel de chimie en 1955. Depuis ce jour, plusieurs groupes ont étudié cette hormone au niveau du système reproducteur et encore aujourd'hui, l'OT est le seul médicament autorisé par la *Food and Drug Administration* États-Unienne pour la provocation des contractions utérines.

2.2. Structure de l'ocytocine

D'un point de vue structurel, l'OT possède 9 acides α -aminés (**Figure 3**) ayant comme formule chimique : $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$. Sa masse moléculaire est de 1,007 Da. Ce nonapeptide possède 2 résidus cystéine (*Cys*-1 et *Cys*-6) lui attribuant une structure secondaire cyclique, connue comme essentielle à son activité agoniste, et possède une queue de trois résidus α -aminés en C-terminal.

Figure 3. Structure primaire de l'ocytocine.



2.3. Effets de l'ocytocine sur les organes reproducteurs

2.3.1. Contractions utérines et éjection du lait

Connue depuis 1895 pour ses propriétés utérotoniques (contraction des muscles lisses de l'utérus), l'OT est reconnue comme indispensable au réflexe d'éjection du placenta. Ainsi, elle est utilisée cliniquement dans l'induction des contractions utérines, dans le traitement des rétentions placentaires et des hémorragies post-partum (Association des pharmaciens du Canada, 1998), chez la femme.

Un autre rôle classique de l'OT est la stimulation de l'éjection du lait suite à la stimulation mammaire par la tétée. Chez l'humain, l'éjection de lait se produit de 30 secondes à 1 minute après que le bébé ait commencé à téter. Ce processus devient, par la suite, un réflexe qui peut être déclenché par un stimulus autre que mécanique, comme l'heure des boires ou les pleurs du bébé (McNeilly, A.S., 1983; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001). Il est à noter que l'OT n'est pas responsable de la production du lait, laquelle est sous la dépendance de la prolactine et des œstrogènes, mais elle est nécessaire au développement des unités lobulo-alvéolaires de la glande mammaire en post-partum (Wagner, K.U., 1997).

2.3.2. Fonctions reproductrices mâles

Chez l'homme, des études indiquent la présence des récepteurs à l'OT au niveau des testicules, de l'épididyme ainsi que de la prostate, suggérant une implication de l'OT dans la contraction de la prostate ainsi que dans l'expulsion des sécrétions prostatiques lors de l'éjaculation (Nicholson, H.D. & Jenkin, L., 1995; Ivell, R., 1997; Frayne, J. & Nicholson, H.D., 1998). De plus, la détection d'OT durant l'éjaculation suggère que l'hormone participe au transport du sperme en facilitant la contraction des muscles lisses de l'épididyme et est impliquée dans la modulation du métabolisme des stéroïdes sexuels au niveau des testicules et de l'épididyme (Nicholson, H.D. & Jenkin, L., 1995). D'autres études indiquent que, suite à une injection intracérébrale au niveau des noyaux paraventriculaires (PVN), l'OT est un puissant agent pour induire l'érection (Argiolas, A., 1992).

2.4. Effets de l'ocytocine sur le comportement

2.4.1. Influence sur le comportement sexuel

Concernant le comportement sexuel, Carmichael *et al.* (1987) ont observé des taux plus élevés d'OT durant l'orgasme qu'en période pré ou post-orgasme, autant chez l'homme que chez la femme. Cette étude semble indiquer que l'OT est impliquée dans l'excitation sexuelle et/ou l'origine de la sensation de satisfaction et/ou de la satiété éprouvée après une relation sexuelle.

2.4.2. Interactions sociales et attachement maternel

Observée au sein de plusieurs espèces, l'OT facilite les interactions sociales, la reconnaissance ou mémoire sociale, contribue à l'attachement maternel et à la formation des couples (Uvnäs-Moberg, K., 1998 ; Young, L.J., 1998; Williams, J.R., 2004). Mis ensembles, ces travaux suggèrent un rôle essentiel de l'OT dans l'attachement entre la femelle mammifère et son nouveau-né. De plus, des études effectuées chez des brebis non gestantes ont montré que l'injection d'OT par voie intraventriculaire cérébrale permettait de produire artificiellement des réflexes maternels, similaires à ceux observés par la libération de progestérone en combinaison à une stimulation vagino-cervicale. Par contre, cet effet est annulé si la brebis est sous anesthésie péridurale (Keverner, E.B., 1994).

2.4.3. Développement de la confiance sociale

Une étude récente parue dans la célèbre revue *Nature* (Kosfeld, M., 2005) indique que l'administration intra nasale d'OT augmente le niveau de confiance entre les humains. L'expérience consistait en un jeu de rôles dont les participants devaient décider ou non de confier de l'argent à une personne n'inspirant pas confiance mais promettant d'importants bénéfices. Près de 50% des sujets ayant inhalé de l'OT ont décidé de confier leur argent à l'investisseur douteux, tandis que 20% seulement des sujets ayant inhalé le placebo ont accepté de le faire.

2.5. Autres effets de l'ocytocine

L'ocytocine montre des effets anti-stress et anti-nociceptif (Kordower, J.H., 1984 ; Uvnäs-Moberg, K., 1998 ; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001). En effet, autant chez les rats mâles que femelles, suite à 5 jours d'injections *s.c.* quotidiennes d'OT, une légère diminution de la pression artérielle, une diminution des taux de cortisol, une plus grande tolérance à un stimulus douloureux et une augmentation des concentrations d'insuline et de cholécystokinine sont observés (Uvnäs-Moberg, K., 1998). Un effet sédatif est également observé suite à l'administration d'OT en bolus *i.v.* (Uvnäs-Moberg, K., 1994).

Tel que constaté, l'OT n'est pas une hormone exclusive au sexe féminin, bien qu'elle soit soumise à une forte influence des hormones stéroïdiennes ou gonadiques féminines, elle est retrouvée en concentrations équivalentes dans la neurohypophyse et dans le plasma des mâles comme des femelles, suggérant d'autres rôles possibles de cette hormone que ceux exercés sur les fonctions reproductrices (Aston, N. & Balment, R.J., 1991). Cette observation s'avère particulièrement intéressante dans l'étude de ses effets rénaux et cardiovasculaires qui seront abordés aux sections 2.8 et 2.9.

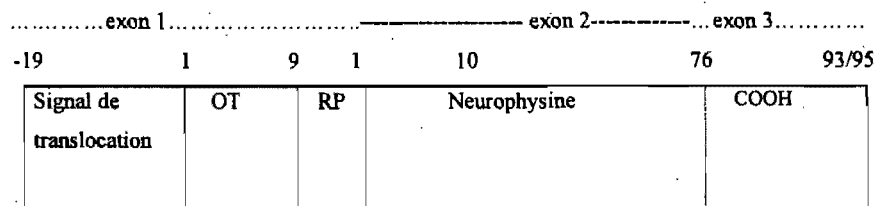
2.6. Régulation de la production, de la sécrétion et de la dégradation de l'ocytocine

2.6.1. Gène de l'ocytocine

Chez l'humain, le gène de l'ocytocine est situé sur le chromosome 20p13, il code pour un pré-propeptide. Ce gène comporte trois exons codant pour : 1- une région de translocation du signal, la protéine OT bioactive et une région processive du signal (RP), 2- la protéine neurophysine et 3- la région C-terminale de la neurophysine (**Figure 4**).

Figure 4. Gène de l'ocytocine-neurophysine

(tirée et modifiée de Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001)



2.6.2. Biosynthèse de l'ocytocine

Suite à son expression génique, l'OT est synthétisée sous forme de pré-propeptide au niveau des corps cellulaires de la région magnocellulaire neurosécrétoire des noyaux paraventriculaires (PVN) et supraoptiques (SON) de l'hypothalamus (Brownstein, M.J., 1980). Ce pré-propeptide est ensuite clivé par protéolyse en OT et en neurophysine, subit d'autres modifications de maturation lors de son transport, sous forme d'un complexe OT-neurophysine, le long des axones depuis l'hypothalamus jusqu'aux boutons terminaux de la neurohypophyse. Le complexe OT active-neurophysine est alors emmagasiné dans des granules de sécrétion jusqu'à ce qu'un stimulus induise l'exocytose de l'OT en circulation sanguine (Renaud, L.P. & Bourque, C.W., 1991). La neurophysine est connue comme une protéine de transport qui lie l'OT de même que la vasopressine, autre hormone emmagasinée dans la neurohypophyse, lors de son transport axonal ainsi que dans l'entreposage vésiculaire. En effet, au niveau des granules de sécrétion, l'OT est retrouvée liée en forte concentration (>0,1 M), dans un ratio 1:1 avec la neurophysine. Cette force de liaison entre l'OT et la neurophysine est grandement favorisée en milieu acide, telle que retrouvée dans les granules de sécrétion (pH ~5.5), par les interactions de types liaisons hydrogène. Lorsque le complexe arrive en circulation sanguine (pH ~7.4), sa dissociation est favorisée, ce qui induit la relâche d'OT biologiquement active (Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001).

2.6.3. Régulation centrale de la production et de la sécrétion d'ocytocine

La régulation de la production d'OT se fait par voie nerveuse. Suite à la stimulation des corps cellulaires des neurones des noyaux PVN et SON de l'hypothalamus, les potentiels d'action entraînent une dépolarisation membranaire parcourant l'axone jusqu'aux boutons terminaux du neurone, lesquels sont situés dans la neurohypophyse, entraînant ainsi la relâche d'OT en circulation sanguine systémique. La force et la fréquence des stimulations électriques reçues au niveau des noyaux PVN et SON déterminent le taux de sécrétion d'OT en circulation (Poulain, D.A. & Wakerley, J.B., 1982; Bicknell, R.J., 1985).

Cependant, une autre population de neurones ocytocinergiques a été identifiée dans les noyaux PVN. Ces neurones ne se projettent pas dans la neurohypophyse, mais rejoignent d'autres régions du cerveau telles que l'amygdale, le striatum, le noyau raphe, le bulbe olfacteur, le *locus coeruleus*, la corne dorsale de la moelle épinière ainsi que les neurones sympathiques préganglionnaires (Sofroniew, M.W., 1983; Buijs, R.M., 1983). Ces projections contribuent à l'augmentation de la concentration d'OT dans le liquide cébrospinal. Les effets de l'OT sur le comportement (section 2.4) et les effets cardiovasculaires (section 2.9) originent entre autre de ces projections. Par ailleurs, un rythme circadien de l'OT au niveau du liquide cébrospinal a été observé chez l'humain, avec un pic maximal se situant vers la mi-journée, mais aucune sécrétion circadienne n'a pu être enregistrée au niveau des concentrations plasmatiques de l'OT (Amico, J.A., 1983). Ainsi, au niveau plasmatique, la sécrétion d'OT se produit de manière intermittente sans être dictée par aucun rythme biologique mais plutôt en réponse aux stimuli périphériques (Brimble, M.J. & Dyball, R.E.J., 1977 ; Brimble, M.J., 1978). À l'inverse de d'autres hormones, l'OT ne bénéficie pas d'un dispositif de rétrocontrôle (*feed-back*) qui permettrait de moduler sa production. C'est pourquoi on peut en observer des pics plasmatiques importants et une sécrétion sur un mode « pulsatile », durant l'accouchement ainsi que lors de la lactation (Brimble, M.J. & Dyball, R.E.J., 1977 ; Brimble, M.J., 1978 ; Higuchi, T., 1985 ; Fuchs, A.R., 1991 ; Uvnäs-Moberg, K. & Eriksson, M., 1996). La fréquence des pulsations atteint un maximum durant le dernier stade de l'accouchement (Fuchs, A.R.,

1991). Ce mode de sécrétion représente un avantage lors du long processus du travail, en assurant une activité contractile efficace et rapide de l'utérus envers l'OT, puisque la sécrétion pulsatile est un mécanisme qui évite une désensibilisation trop rapide des récepteurs suite à la liaison du ligand (Crall, H.D., 1991).

2.6.4. Dégradation de l'ocytocine

L'OT est dégradée par l'enzyme ocytocinase (EC 3.4.11.3), enzyme de la grande famille des aminopeptidases, qui est présente dans le placenta, l'endothélium vasculaire, la muqueuse gastro-intestinale, le canal biliaire, l'épithélium pulmonaire bronchique, les tubules rénaux, les glandes sudoripares, les adipocytes et les muscles squelettiques (Lundin, S., 1993; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001). Au niveau des cellules endothéliales vasculaires ainsi que dans le myocarde, l'ocytocinase est activée suite à la liaison de l'OT à son récepteur, ce qui stimule la translocation de l'enzyme du cytosol à la surface cellulaire (Nakamura, H., 2000; Tsujimoto, M. & Hattori, A., 2004). L'ocytocinase dégrade l'OT par clivage au niveau d'acides aminés particuliers, ce qui la rend biologiquement inactive. Les aminopeptidases peuvent également cliver d'autres peptides tels que la vasopressine, l'angiotensine III, Met-enképhaline, neurokinine A et neuromédine B (Tsujimoto, M. & Hattori, A., 2004). Par ailleurs, l'OT peut être clivée par d'autres protéases tel qu'indiqué :

- Entre les résidus Cys-1 et Tyr-2 ; clivage par une cystéine aminopeptidase telle la vasopressinase
- Clivage du pont disulfure par un thiol (protéine-disulfide oxidoréductase)
- Clivage du résidu terminal Gly-9 par la chymotrypsine (d'où son inactivation lorsque administré par la voie orale ; voir paragraphe 2.10.7)
- Clivage du résidu Leu-8 par la leucine aminopeptidase (Fernando, A., 2000)

Ces différentes peptidases permettent un contrôle de la concentration plasmatique d'OT, ce qui lui confère un temps de demi-vie d'élimination de 20 minutes (Fabian, M., 1969).

2.7. Récepteur de l'ocytocine

2.7.1. Génétique du récepteur

Le gène codant pour le récepteur de l'ocytocine est situé sur le locus 3p25-3p26.2 du génome humain (Inoue, T., 1994) et possède une taille de 17 kb. Il contient 3 introns et 4 exons (Inoue, T., 1994 ; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001). Ce gène code pour un polypeptide de 389 acides aminés comprenant 7 domaines transmembranaires (hélices α) hydrophobes, caractéristique des récepteurs couplés à une protéine G (RCPG). Le récepteur de l'OT appartient à la classe I des RCPGs, tel le récepteur à la rhodopsine.

2.7.2. Distribution du récepteur

On retrouve des récepteurs de l'OT dans plusieurs tissus, plus particulièrement dans l'utérus mais aussi dans la glande mammaire, le cerveau (système limbique, cortex, système olfactif, hypothalamus), le thymus, les ovaires, et les testicules (Soloff, M.S., 1979; Fuchs, A.R., 1984 ; Russell, J.A., 1998; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001). La densité des récepteurs OT dans l'utérus augmente en cours de gestation, surtout vers l'approche de la parturition ou de l'accouchement, contribuant à son rôle physiologique important tel que discuté à la section 2.3 (Soloff, M.S., 1979; Fuchs, A.R., 1984 ; Russell, J.A., 1998; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001). Chez le rat et l'humain, des chercheurs remarquent une augmentation importante dans la densité des récepteurs OT au niveau de l'utérus, dès le commencement du travail, jusqu'à 200 fois supérieure de la concentration observée chez la femelle non gestante. Suite à l'accouchement, la concentration des récepteurs diminue drastiquement pour revenir aux taux de base (Fuchs, A.R., 1984).

Outre son expression dans les organes reproducteurs, des récepteurs de l'OT sont trouvés dans les muscles lisses vasculaires (Chen, Y.L., 1999) mais également dans les quatre compartiments du cœur ainsi que dans l'endothélium des vaisseaux sanguins (Jankowski, M., 1998 et 2000, Cicutti, N.J., 1999; Thibonnier, M., 1999), ce qui suggère une implication de l'OT dans la régulation des fonctions cardiovasculaires. Également, l'expression du récepteur OT au niveau cardiaque

démontre une variation considérable selon le stade de la gestation. En effet, l'expression est plus élevée durant les deux premiers trimestres de gestation et diminue par la suite à des concentrations inférieures à celles retrouvées chez la femelle non gestante. Ces concentrations remontent de nouveau en post-partum (Mukaddam-Daher, S., 2002). De plus, l'expression des récepteurs de l'OT aux niveaux cardiaques et vasculaires est plus importante chez le fœtus que chez le nouveau-né et encore plus que chez l'adulte (Jankowski, M., 2004), suggérant fortement un rôle de l'OT en organogenèse cardiovasculaire.

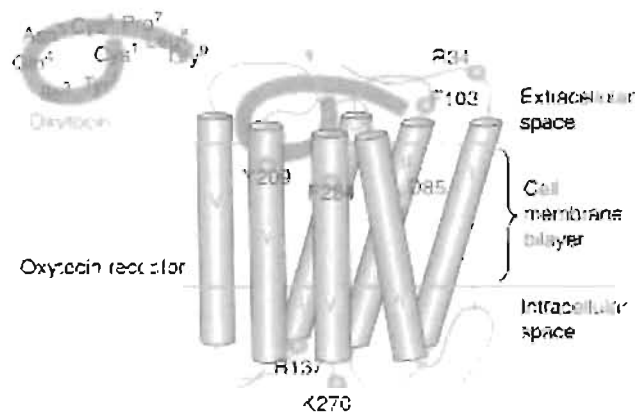
Dans le rein, des récepteurs de l'OT se retrouvent dans le cortex rénal et sont concentrés principalement à la *macula densa*. Des récepteurs sont également trouvés dans la médulla, au niveau de l'anse de Henle du néphron juxta-médullaire (Arpin, B.M., 1997). Il s'agirait probablement de sous-types différents de récepteurs puisque ces deux sites rénaux ne démontrent pas la même sélectivité pour lier l'OT (Arpin, B.M., 1997; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001). La localisation des récepteurs OT dans le rein attribue un rôle potentiel de l'ocytocine dans la régulation de la rétroaction tubulo-glomérulaire ainsi que dans le transport des solutés (Arpin, B.M., 1997; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001).

2.7.3. Interaction du récepteur avec l'ocytocine

Des études de mutagenèse indiquent que le domaine NH₂-terminal de la première boucle extracellulaire du récepteur OT interagit avec la partie linéaire COOH-terminale de l'OT (constitué de trois acides α -aminés), tandis que la deuxième boucle extracellulaire du récepteur OT interagit avec la partie cyclique de l'hormone (Postina, R., 1996) (Figure 5).

Le résidu *asparagine* du domaine transmembranaire II (ASP-85 du récepteur OT humain) ainsi que la première boucle intracellulaire du récepteur sont importants pour l'activation de ce dernier (Bockaert, J. & Pin, J.P., 1999).

Figure 5. Modèle du récepteur de l'OT en interaction avec son ligand OT.



Légende explicative : Le ligand ocytocine est illustré en rouge dans sa conformation cyclique avec ses résidus numérotés 1-9. Les sept domaines transmembranaires du récepteur OT sont indiqués en chiffres romains (tiré de Zingg, H.H., 2003).

2.7.4. Interaction du récepteur à l'ocytocine avec un peptide apparenté; la vasopressine

Le récepteur de l'OT peut interagir avec d'autres peptides de structure chimique similaire, telle la vasopressine (AVP), qui ne diffère de l'OT que de deux acides aminés soit, en position 3 et 8 (**Tableau I**). L'OT se distingue par un acide aminé neutre en position 8 tandis que l'AVP contient un acide aminé basique à cette position (**Tableau I**). Ces différences de polarité permettent la spécificité de liaison à leur propre récepteur, OT ou AVP. Par exemple, le résidu *Ile* en position 3 de l'OT est essentiel à la stimulation du récepteur de l'OT et le résidu *Arg* en position 8 de l'AVP est quant à lui essentiel à la stimulation du récepteur de l'AVP (Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001; Barberis, C., 1998). Cependant, ils peuvent tout de même avoir de l'affinité pour les deux récepteurs.

Tableau I. Similarités entre les structures primaires de l'ocytocine et de la vasopressine

Molécule	Position de l'acide aminé								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ocytocine	<i>Cys</i>	<i>Tyr</i>	<i>Ile</i>	<i>Gln</i>	<i>Asn</i>	<i>Cys</i>	<i>Pro</i>	<i>Leu</i>	<i>Gly-NH₂</i>
Vasopressine	-	-	<i>Phe</i>	-	-	-	-	<i>Arg</i>	-

2.7.5. Sélectivité et affinité des récepteurs pour l'ocytocine et la vasopressine

Il existe une grande homologie entre les hormones OT et AVP au niveau des sites de production où le PVN contient une majorité de neurones OT (*versus* AVP) et le SON une majorité de neurones AVP (*versus* OT) (Langraf, R., 1990; Antunes-Rodrigues, J., 2004). Également, on remarque une importante homologie entre les récepteurs de l'OT et ceux de l'AVP, particulièrement au niveau des boucles extracellulaires et hélices transmembranaires (Postina, R., 1996; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001).

Le récepteur OT démontre une faible sélectivité pour les ligands OT et AVP. Cependant, l'OT a dix fois plus d'affinité pour ce dernier que l'AVP (Kimura, T., 1994; Chini, B., 1996). Lors de la liaison de l'OT à son récepteur, c'est la partie cyclique de l'hormone qui est la plus importante dans la sélectivité de liaison, comparativement à sa partie linéaire qui est constituée de trois acides aminés (Postina, R., 1996; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001). L'AVP est un agoniste partiel du récepteur de l'OT, pour laquelle une concentration de cent fois supérieure à celle de l'OT est nécessaire pour entraîner la même réponse (Kimura, T., 1994). De hautes concentrations d'OT peuvent aussi interagir avec les récepteurs V₁ et V₂ de l'AVP (voir paragraphes 2.8.2 et 2.8.7) (Thibonnier, M., 1999). L'interaction des deux résidus aromatiques *tyrosine-209* et *phenylalanine-284* du récepteur OT avec l'AVP est responsable de son activité agoniste partiel (Chini, B., 1996).

Le récepteur de l'AVP (comprenant les sous-types V_1 , V_2 et V_3) est quant à lui retrouvé dans les cellules musculaires lisses, le foie, dans l'hypophyse antérieure et au niveau rénal. Puisqu'il existe une grande homologie dans la structure de l'OT et de l'AVP, cette similarité confère à l'OT la capacité de se lier au récepteur de l'AVP. Cependant, l'OT possède moins d'affinité pour ce récepteur et est moins puissante que l'AVP ($EC_{50} = 1.6 \times 10^{-8}$ M (OT) versus 7.4×10^{-10} M (AVP), pour le récepteur V_2 de l'AVP) (Joo, K.W., 2004).

2.7.6. Mécanisme de la transduction du signal

Le récepteur de l'OT est couplé à une protéine $G_{q/11}$ (Sanborn, B.M., 1998; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001; Antunes-Rodrigues, J., 2004). Suite à la liaison ligand-récepteur, il y a un couplage à la protéine $G_{q/11}$ hétérotrimérique; la sous-unité $\alpha_{q/11}$ relâche le GDP (forme inactive) et acquiert le GTP (forme active) et va ensuite activer la phospholipase C beta (PLC β). L'activation de la PLC β entraîne le clivage du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP $_2$) ce qui génère deux seconds messagers : l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP $_3$) et le diacylglycérol (DAG). L'IP $_3$, par liaison à ses récepteurs au niveau du réticulum endoplasmique, provoque l'augmentation de calcium intracellulaire (Ca^{2+}_i). Le DAG active une protéine kinase C, ce qui entraîne la phosphorylation de différentes protéines cibles. Une cascade d'évènements se produira en réponse à l'augmentation de Ca^{2+}_i . Au niveau de la relaxation vasculaire, le Ca^{2+}_i se lie à la calmoduline (CaM) formant le complexe Ca^{2+}/CaM capable d'activer la NO synthase (NOS) qui génère le monoxyde d'azote (NO). Le NO active par la suite la guanylate cyclase soluble et provoque une augmentation de guanosine-3', 5'-monophosphate cyclique (GMPc) capable notamment d'activer des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK). Cette cascade de signalisation est responsable des effets connus de l'OT sur la relaxation vasculaire, les fonctions cardiaques (effets inotrope et chronotrope négatifs) et rénale (fermeture des canaux Na^+ de la lumière tubulaire, entraînant une natriurèse). Au niveau du muscle lisse, le complexe Ca^{2+}/CaM active la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK), responsable de la contraction observée au niveau des muscles lisses de l'utérus ou des cellules mammaires myoépithéliales. Au niveau des cellules neurosécrétoires dans le cerveau, l'augmentation des concentrations de Ca^{2+}_i module l'excitation

cellulaire et la relâche de neurotransmetteurs. Au niveau rénal (*macula densa* et segment grêle de l'anse de Henle), on suspecte deux sous-types de récepteurs OT qui pourraient générer des effets distincts de l'OT (Arpin-Bott, M.P., 1997), soit un couplage à la protéine $G_{q/11}$ ou à la protéine G_s , responsable de l'activation de l'adénylate cyclase (AC), de la production d'AMPc et de l'activation de protéines cibles AMPc-protéine kinase dépendantes. Enfin, l'OT aurait des effets indirects *via* la libération d'ANP (soit par une stimulation de l'OT circulante atteignant le cœur, soit par une production locale, cardiaque, d'OT) qui, lui-même en se fixant sur son récepteur membranaire, stimule une guanylate cyclase génératrice de GMPc. Ainsi, la libération d'ANP viendrait renforcer les effets originaux de l'OT induits par la GMPc, tels que mentionnés plus haut, soit la relaxation vasculaire, des effets inotropes et chronotropes négatifs, la fermeture des canaux Na^+ de la lumière tubulaire, entraînant une natriurèse et l'activation de MAPK, entre autres.

L'augmentation rapide de Ca^{2+}_i entraîne également la synthèse de prostaglandine PGE_2 par l'activation de la cyclooxygénase (COX) (Flint, A.P., 1986). La liaison de l'OT à son récepteur peut également activer d'autres effecteurs tels la MAPK, laquelle induit l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) qui transforme l'acide arachidonique en prostaglandines (Arias, F., 2000).

2.7.7. Mécanisme de désensibilisation du récepteur de l'ocytocine

Suite à la stimulation persistante des récepteurs par leur agoniste, il y a souvent un mécanisme de contrôle appelé « désensibilisation des récepteurs ». Le récepteur de l'OT subit une désensibilisation par internalisation selon un mécanisme dépendant des clathrines. Suite à l'internalisation du récepteur OT dans les endosomes, ce dernier est dégradé et non recyclé à la surface cellulaire (Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., unpublished data). La désensibilisation est un processus lent qui requiert une exposition chronique du récepteur à son agoniste. En effet, il a été observé qu'une infusion d'OT de très longue durée (>24 heures) provoque une diminution de la réponse utérine, possiblement due à la diminution du nombre de récepteurs suite à leur internalisation (Crall, H.D., 1991).

2.8. Pharmacodynamie de l'ocytocine sur les fonctions rénales

2.8.1. Régulation de l'homéostasie hydrique

Notre intérêt, envers l'observation et la connaissance des effets de l'OT sur les fonctions rénales, est important dans le cadre de ce projet puisque qu'il est à la base de notre hypothèse de départ, qui sera expliquée dans la section 2.11. Avant de discuter des effets directs et indirects de l'OT en physiologie rénale, voici un bref rappel de la régulation hydro électrolytique.

La régulation précise du volume et de l'osmolarité des fluides corporels est fondamentale à la survie et est d'importance capitale d'un point de vue physiologique et clinique. L'eau et les électrolytes sont responsables de la stœchiométrie adéquate des réactions métaboliques pour la conservation du volume et des propriétés électriques des cellules. Le sodium (Na^+) représente un important électrolyte du liquide extracellulaire et est un déterminant majeur de l'osmolarité et du volume extracellulaire (Silveira, P.F., 2004). Le potassium (K^+), constituant important des liquides intracellulaires, est localisé dans la cellule et son rôle est essentiel dans la repolarisation électrique membranaire, phase majeure déterminant la capacité subséquente de dépolarisation cellulaire. De plus, un déséquilibre à la hausse des concentrations de K^+ extracellulaires est une indication de mortalité cellulaire et une source majeure d'effets secondaires, en effet l'hyperkaliémie peut conduire à des arythmies cardiaques létales.

Le rein est un organe essentiel dans la conservation de cet équilibre hydro électrolytique. En plus d'excréter les déchets de l'organisme, les reins règlent le volume et la composition chimique du sang en conservant le juste équilibre entre l'eau et les électrolytes d'une part, et entre les acides et les bases d'autre part (Valtin, H., 1983). Le maintien étroit de l'osmolarité et du volume des liquides corporels requiert des réponses du système neuro-endocrinien, relativement à la réabsorption et à l'excrétion de l'eau et du Na^+ par le rein, ainsi qu'à la modulation de la soif et de l'appétit pour le sel au niveau du système nerveux central (Bourque, C.W., 1994; Antunes-Rodrigues, J., 2004).

Les mammifères contrôlent l'osmolarité et le volume des fluides corporels en réponse à des stimuli provenant autant des compartiments intracellulaires qu'extracellulaires. Ces stimuli sont perçus par trois types de récepteurs : les osmorécepteurs (récepteurs chimiques), les volorécepteurs (sensibles au volume) et les barorécepteurs (sensibles à la pression sanguine artérielle) (Antunes-Rodrigues, J., 2004). Les premiers sont situés entre autre au niveau de la *macula densa* dans la paroi du tubule contourné distal de l'appareil juxta-glomérulaire rénal. Des osmorécepteurs sont également présents au niveau de structures cérébrales situées en dehors de la barrière hémato encéphalique, et sont à même de traduire les changements de pression osmotique en signaux électriques qui activent les régions du système nerveux central responsables du contrôle de l'excrétion hydrique, de la soif et de l'appétit pour le sel (Antunes-Rodrigues, J., 2004). Ces dernières sont ainsi en contact étroit avec les concentrations plasmatiques des ions et hormones telles que le facteur (peptide) atrial natriurétique (ANP) et l'angiotensine II. Les autres, volo- et barorécepteurs, qui détectent les changements de volume et de pression, sont situés dans la paroi des artérioles afférentes et efférentes de l'appareil juxta-glomérulaire, mais on en retrouve également dans la paroi du sinus carotidien et du sinus de l'aorte, dans l'oreillette et le ventricule myocardiques (Heller, L.J., 1981; Valtin, H., 1983).

2.8.2. Régulation de la relâche des hormones neurohypophysaires dans le maintien de l'homéostasie hydro électrolytique

D'un point de vue physiologique, le système hypothalamo-hypophysaire joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie hydrique par la relâche de l'hormone neurohypophysaire AVP en réponse à des stimuli osmotiques ou non osmotiques. L'OT est aussi impliquée dans la régulation de l'équilibre hydro électrolytique, elle est également relâchée en circulation lors de stimuli osmotiques et non osmotiques (Antunes-Rodrigues, J., 2004).

Dans la situation où les volo- et barorécepteurs rénaux et artériels détectent une **diminution du volume sanguin et/ou de la pression sanguine**, lors d'une hémorragie ou d'une déshydratation par exemple, cela entraîne la relâche d'AVP

en association avec l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone. La libération d'AVP est provoquée par la stimulation des volo- et barorécepteurs et la concentration circulante en angiotensine II. Cette dernière, outre la libération d'AVP, entraîne une vasoconstriction et stimule aussi la libération d'aldostérone, principal minéralocorticoïde sécrété par les glandes surrénales. L'aldostérone agit grâce à un récepteur spécifique, appelé récepteur minéralocorticoïde, dont la fonction essentielle est la régulation de la balance hydro-sodée (réabsorption active de Na^+ et passive d'eau et excrétion de K^+) et en conséquence de la pression artérielle sanguine qui lui est liée. Ce récepteur est exprimé au niveau du tubule contourné distal du rein et contrôle directement l'expression des gènes codants pour les protéines qui contrôlent la réabsorption de Na^+ et l'excrétion de K^+ . L'AVP a également des propriétés vasoconstrictrices (par stimulation des récepteurs V_{1a}) et agit au néphron rénal distal en augmentant la réabsorption d'eau par stimulation des récepteurs V_2 et activation des aquaporines-2, de manière à augmenter le volume sanguin et par conséquent, la pression sanguine en favorisant l'anti-diurèse (Antunes-Rodrigues, J., 2004). Les récepteurs V_{1a} sont des RCPG couplés à la protéine $G_{q/11}$ (hydrolyse du PIP_2) alors que les récepteurs V_2 sont couplés à la protéine G_s qui active l'adénylate cyclase (Birnbaumer, M., 1992). Cependant, la sécrétion d'AVP est inhibée lors d'une augmentation de la volémie, permettant ainsi l'excrétion d'eau (Haanwinckel, M.A., 1995). En fait, lors d'une augmentation de la volémie, détectée par les volorécepteurs, il s'en suit un influx au système hypothalamo-hypophysaire et une relâche d'OT en circulation, qui résulte en la natriurèse et diurèse par action directe, mais aussi indirecte.

Ainsi, lors d'un stimulus d'**hyperosmolarité** et d'**hypovolémie**, les hormones OT et AVP sont relâchées en même temps en circulation, résultant en la natriurèse par l'OT et en anti-diurèse par l'AVP, suggérant un effet synergique des deux hormones (Balment, R.J., 1986; Stroeckel, M.E., 1987). Les taux basaux d'OT chez le rat se situent à 10 pg/mL et doublent pratiquement (~20pg/mL) en condition modérée d'hypernatrémie (Sjöquist, M., 1999). Ainsi, l'AVP est un puissant agent antidiurétique tandis que l'OT est plus puissant que l'AVP pour la natriurèse (Antunes-Rodrigues, J., 2004).

Par ailleurs, il existe une corrélation entre la sécrétion d'OT de l'hypophyse et l'inhibition de l'appétit pour le sel chez le rat, ce qui vient supporter l'effet de l'OT pour contrer l'hyperosmolarité (Stricker, E.M., 1986).

2.8.3. Effets de l'ocytocine sur la natriurèse, la kaliurèse, le taux de filtration glomérulaire et la sécrétion de rénine, au niveau rénal

L'OT est un agent natriurétique et kaliurétique. À hautes doses, il augmente le taux de filtration glomérulaire (TFG) et le débit rénal plasmatique (Ali, M.N., 1958; Forsling, M.L., 1994). L'OT a été répertoriée depuis longtemps pour sa capacité à augmenter l'excrétion de Na⁺ chez le rat, après l'administration de hautes doses de l'hormone (Sawyer, W.H., 1952). D'autres groupes de recherche ont confirmé l'effet natriurétique de l'OT et ce, chez quelques espèces : rats (Fraser, A.M., 1942; Sawyer, W.H., 1952; Chan, W.Y., 1965; Peters, G. & Roch-Ramel, F., 1970; Stier, C.T., 1980; Balment, R.J., 1980; Forsling, M.L., 1982; Garland, H.O., 1983; Conrad, K.P., 1986; Brimble, M.J., 1991; Verbalis, J.G., 1991; Conrad, K.P., 1993; Windle, R.J., 1995; Soares, T.J., 1999; Sjöquist, M., 1999) et chiens (Brooks, F.P., 1958; Chan, W.Y., 1961; Andersen, S.E., 1992). Ses effets natriurétiques et kaliurétiques seraient aussi doses dépendants (Balment, R.J., 1980; Plange-Rhule, J., 1990). La perfusion continue d'OT à des seuils de concentrations physiologiques a également induit de la natriurèse chez l'Homme (Kostoglou-Athanassiou, I., 1994).

L'augmentation du TFG suite à la perfusion continue d'OT et d'AVP n'a été visible qu'à des concentrations semblables à une situation de déshydratation (soit induites par des perfusions 6,67 fois plus élevées que celles pour obtenir des concentrations physiologiques d'OT et d'AVP) (Forsling, M.L., 1994). Mais les deux taux de perfusion continue ont engendré une réponse dose-dépendante natriurétique, avec anti-diurèse pour l'AVP et diurèse pour l'OT chez le rat. La natriurèse peut donc se produire même sans augmentation du TFG indiquant le site d'action tubulaire distal de l'OT (Forsling, M.L., 1994). Il est à noter que l'absence d'effet de l'OT sur le TFG avait été précédemment rapportée (Chan, W.Y. & Du Vigneaud, V., 1970; Stier, C.T., 1980; Garland, H.O., 1983) avec des

études sur des reins entiers ou des néphrons isolés démontrant que les effets salurétique et diurétique de l'OT n'étaient pas reliés à une inhibition de réabsorption tubulaire proximale. Ce résultat sous-tendait déjà un site d'action distal (tubulaire) de l'OT (voir paragraphe 2.7.6). Il est à noter dans cette étude que l'effet diurétique était prédominant après l'effet salurétique soulignant une possible indépendance des effets électrolytiques et hydriques de l'OT.

Il a été trouvé, chez le rat anesthésié, que l'OT induit une natriurèse, une kaliurèse et une diurèse conséquentes lors de perfusion continue (reproduisant la sécrétion continue de l'animal souffrant d'hyperosmolarité) mais pas lors d'administration pulsatile de la même dose totale d'OT répartie sur des injections répétées toutes les 5-10 min (reproduisant la sécrétion pulsatile observée lors de la lactation) (Sjöquist, M., 1999). Il est intéressant de noter que les deux modes d'administration induisent la relâche de rénine. Dans cette étude, le seuil de concentration apparent d'OT avant d'observer la natriurèse était de 15-26 pg/mL, mais d'autres études ont rapporté des valeurs moins élevées (Verbalis, J.G., 1991; les valeurs obtenues = 5-6 pmol/L, soit 5-6 pg/mL OT). Une autre étude a trouvé que l'OT induit la relâche de rénine, cependant cet effet serait contrôlé indépendamment de la natriurèse (Sjöquist, M., 1999). Par ailleurs, la stimulation de la sécrétion de rénine suite à une perfusion continue élevée (125 ng/kg/hr) d'OT (Huang, W., 2000) pourrait s'intégrer dans un concept **pathophysiologique** plus large :

- L'OT est sécrétée lors d'un **syndrome d'hyperosmolarité** (Stricker, E.M., 1986; Huang, W., 1996). La natriurèse (ou plus exactement la salurèse) générée vise à diminuer cette hyperosmolarité induite par exemple lors de déshydratation (Huang, W., 1996).
- Lors d'**hypovolémie, hémorragie ou hypotension** (Stricker, E.M., 1986; Schiltz, J.C., 1997), la sécrétion d'OT observée est associée à celle d'AVP. Le but visé est la rétention de fluide par anti-diurèse (voir paragraphes 2.8.7 & 2.8.8) et un contrôle précis de la natriurèse et de la kaliurèse accentué par la mise en jeu de systèmes intermédiaires (ANP, NO) susceptibles d'accroître l'excrétion d'électrolytes (voir paragraphe

2.8.4). En effet la natriurèse induite par les hormones neuro-hypophysaires est contrée par l'effet anti-natriurétique de l'aldostérone ainsi que par les baisses de débit sanguin rénal et de volémie. L'intérêt se situerait dès lors dans la capacité de l'OT à stimuler la libération de rénine qui engendre la mise en route du système rénine – angiotensine – aldostérone – AVP.

2.8.4. Facteurs affectant la réponse natriurétique de l'ocytocine

À des concentrations physiologiques (~ 30 pmol/L), seul un effet natriurétique de courte durée a été observé lors de l'infusion i.v. d'OT (Verbalis, J.G., 1991). Ainsi, l'OT entraîne un effet natriurétique dose dépendant qui n'est pas maintenu dans le temps, possiblement par désensibilisation du récepteur de l'OT au niveau rénal et/ou par l'effet opposé de l'aldostérone sur la natriurèse.

Il est connu que la sécrétion d'OT en période de lactation se produit de façon intermittente et n'est pas accompagnée d'une augmentation de l'excrétion de Na^+ . Tel que souligné dans le paragraphe précédent, des modes d'administration différent d'OT (pulsatile *versus* continue) ont entraîné des effets rénaux fort différents : taux d'excrétion 10 fois plus élevée de Na^+ ainsi qu'une diurèse et une excrétion accrue de K^+ lorsqu'administré en mode continu (Sjöquist, M., 1999).

Le NO au niveau du système nerveux central est un modulateur de la relâche hypophysaire d'OT et d'AVP. La production de NO inhibe de façon tonique la sécrétion basale de ces hormones. Lors d'hypovolémie, de privation d'eau ou d'injection d'angiotensine II l'inhibition sera préférentielle sur l'OT *versus* l'AVP pour ainsi privilégier la rétention hydrique et la fuite électrolytique (Kadekaro, M. & Summy-Long, J.Y., 2000).

2.8.5. Mécanisme d'action de l'induction de la natriurèse par l'ocytocine

L'OT agit *via* ses récepteurs situés dans des cellules nitrergiques (NO) identifiées dans la *macula densa* et initialement du tubule contourné proximal (Soares, T.J., 1999). Des études ultérieures ont confirmé la localisation des NOS, particulièrement constitutives neuronales (nNOS ou NOS1) et endothéliales

(eNOS ou NOS3). L'eNOS se trouve en quantité au niveau de la vascularisation rénale alors que la nNOS est présente au niveau du tubule proximal et distal, branche ascendante large et tube collecteur (Jarry, A., 2003). La liaison de l'OT sur ses récepteurs rénaux entraîne l'augmentation des concentrations de Ca^{2+} , suivi de la formation d'un complexe avec la calmoduline. Le complexe calmoduline- Ca^{2+} active la NOS qui produit du NO à partir de la L-arginine. Le NO est alors capable d'activer la guanylate cyclase soluble, et entraîne la production de GMPc. Cette augmentation des concentrations de GMPc provoque une diminution de la réabsorption de Na^+ par la fermeture des canaux sodiques du tubule contourné proximal, distal ou du tube collecteur, d'où une inhibition de la réabsorption tubulaire de Na^+ . De plus, une augmentation de la filtration glomérulaire du Na^+ fait suite à la vasodilatation des artéioles afférentes induite par le NO, aboutissant à la natriurèse (Antunes-Rodrigues, J., 2004). Enfin, tel qu'indiqué précédemment, il ne faut pas perdre de vue l'action indirecte de l'OT *via* la relâche d'ANP (Soares, T.J., 1999), ni l'affinité de l'OT pour les récepteurs V_2 rénaux.

2.8.6. Effets de l'ocytocine sur la relâche du facteur atrial natriurétique

Il a été observé que l'OT stimule la libération d'ANP, un puissant peptide natriurétique et diurétique (Gutkowska, J., 1997; Soares, T.J., 1999) en réponse à une expansion du volume sanguin (Haawinckel, M.A., 1995). En effet, les volo- et barorécepteurs rénaux et artériels détectent cette augmentation de la volémie et envoient un signal jusqu'à la région antérieure ventrale du troisième ventricule (AV3V), qui est le centre majeur d'intégration pour la régulation de la composition des fluides corporels et des fonctions cardiovasculaires et rénales. Des neurones ANPergiques se projettent depuis la région AV3V jusqu'à la neurohypophyse, transportant l'influx qui induira la relâche d'OT en circulation, mais également d'ANP (Haawinckel, M.A., 1995; Chriguer, R.S., 2001). La liaison d'OT à ses récepteurs au niveau des cardiomyocytes provoquera une augmentation des concentrations de Ca^{2+} . Cela stimulera la relâche d'ANP, qui était emmagasiné dans les granules de sécrétion de ces cellules. L'ANP en circulation se rendra au rein, particulièrement aux artéioles glomérulaires

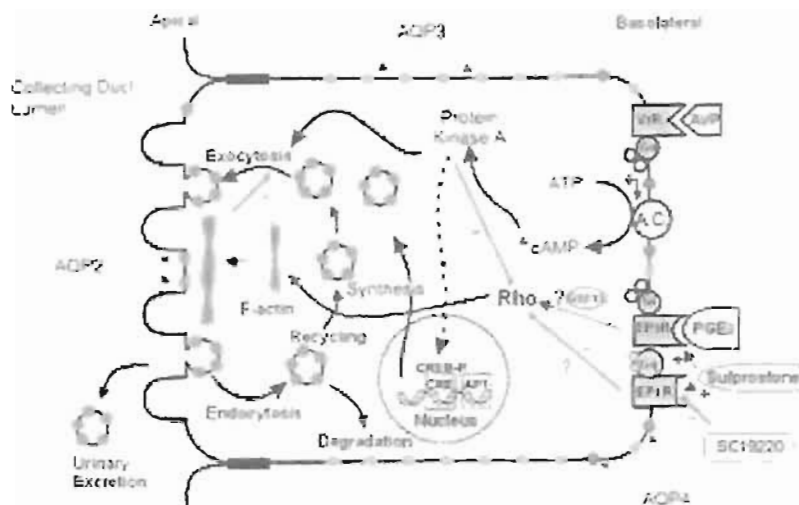
afférentes et efférentes pour lier son récepteur ANPa, ce qui stimule la guanylate cyclase particulée (liée à la membrane) et produit du GMPc. Cette augmentation en GMPc conjointe à l'activation du NO favorise la dilatation des vaisseaux sanguins pré-glomérulaires et contracte les artérioles efférentes, ce qui résulte en une augmentation de la fraction de filtration donc, une augmentation de l'excrétion de Na^+ (Soares, T.J., 1999). De plus, au niveau tubulaire, l'augmentation de GMPc a bien entendu un effet natriurétique. Enfin, il est possible que l'OT locale, produite au niveau cardiaque (Gutkowska, J., 1997), soit responsable d'un contrôle de la relâche d'ANP (Antunes-Rodrigues, J., 2004).

Par ailleurs, il est connu que l'ANP inhibe l'appétit pour le sel et l'eau (Favaretto, A.L.V., 1997), ce qui vient supporter les mécanismes d'homéostasie et contribue au retour à la normale de la volémie.

2.8.7. Mécanisme de l'anti-diurèse causée par la vasopressine

Des récepteurs de l'AVP sont également présents au niveau rénal, le sous-type prédominant est le récepteur V_2 tandis que l'isoforme V_{1a} est retrouvé dans les cellules musculaires lisses ainsi que le foie et l'isoforme V_{1b} est retrouvé dans l'hypophyse antérieure (Keyser, Y.D., 1994; Lolait, S.J., 1995). Ainsi, suite à une augmentation de l'osmolarité (hypertonie) détectés par les osmorécepteurs, il se produit une relâche d'AVP hypophysaire. En situation d'hypovolémie ou d'hypotension, la stimulation de la relâche d'AVP est assurée par l'angiotensine II suite à l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone. Au niveau rénal, l'AVP va se lier au récepteur V_2 (qui est couplé à une protéine Gs), ce qui stimule l'adénylate cyclase, augmentant ainsi les concentrations d'AMPc (Birbaumer, M., 1992). L'AMPc active à son tour une protéine kinase multimérique appelée protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle l'aquaporine-2 dans la minute qui suit la stimulation du récepteur V_2 . Cette étape de phosphorylation est le signal d'insertion de l'aquaporine-2 à la membrane plasmique, ce qui permet l'ouverture et facilite la réabsorption d'eau depuis le filtrat urinaire jusqu'à la circulation. Ainsi, l'ouverture de l'aquaporine-2 est responsable de l'effet antidiurétique de l'AVP. (Joo, K.W., 2004; Chen, Y.C., 2005).

Figure 6. Expression des aquaporines au niveau de la cellule tubulaire suite à la liaison de la vasopressine à son récepteur.
(Tiré de Chen, Y.C., 2005)



- Légende : AQP2 ; Aquaporine 2, joue un rôle de canal permettant la réabsorption d'eau régulée par la vasopressine
 AQP3 ; Aquaporine 3, impliquée dans la concentration de l'urine, elle facilite la sortie de l'eau des cellules épithéliales du tubule collecteur
 AQP4 ; Aquaporine 4, contribue à la sortie d'eau, comme le fait AQP3

L'aquaporine-2 est localisée essentiellement dans le rein, au niveau des cellules principales du tubule collecteur où s'effectue la réabsorption de l'eau régulée par l'AVP (Knepper, M.A., 1997). Elle est située dans des vésicules présentes sous la membrane apicale. La stimulation des cellules par l'AVP induit la fusion de ces vésicules avec la membrane apicale, conférant ainsi à l'ensemble de l'épithélium une perméabilité osmotique importante (Figure 6) (Joo, K.W., 2004; Chen, Y.C., 2005).

Un taux soutenu d'AVP et/ou une épreuve prolongée de déshydratation augmente l'expression du gène de l'aquaporine-2 et sa synthèse protéique. Si l'ouverture des aquaporines-2 au niveau du tube collecteur médullaire est à l'origine de l'augmentation de perméabilité hydrique osmotique et de la propriété anti-diurétique de l'AVP, il a été aussi montré que l'AVP induit à ce niveau une augmentation du taux de Ca^{2+} , liée à une hausse d' IP_3 (Teitelbaum, J., 1991). Cet

effet serait lié à une fixation sur un récepteur apparenté au V_{1a} vasculaire, ou à un récepteur AVP $ni-V_{1a}$, $ni-V_2$, (la possibilité de l'implication des sous-types V_{1b} ou V_3 est à déterminer) ou au récepteur de l'OT (Maeda, Y., 1993). Et la stimulation de ces récepteurs, apparente à des concentrations suprananomolaires (Ando, Y., 1989), induit cette fois-ci une inhibition de la perméabilité hydrique au niveau du tube collecteur, d'où un effet diurétique.

2.8.8. Effets diurétiques / anti-diurétiques répertoriés de l'ocytocine

Curieusement, l'OT connaît une dualité d'action sur la perméabilité hydrique du tube collecteur, similaire à celle observée avec l'AVP (Han, J.S., 1993). En effet, l'AVP et l'OT ont montré à la fois des effets stimulants et inhibiteurs de la perméabilité hydrique; les premiers à des concentrations subnanomolaires, les seconds à des concentrations suprananomolaires (Han, J.S., 1993). En fait, de nombreuses études antérieures chez le rat ou le chien, ont trouvé que l'OT avait (**Tableau II**) soit des effets diurétiques, soit une absence d'effet sur la diurèse associés à la salurèse chez le rat (Fraser, A.M., 1942; Sawyer, W.H., 1953; Chan, W.Y., 1965; Peters, G. & Roch-Ramel, F., 1970; Chan, W.Y. & Du Vigneaud, V., 1970; Balment, R.J., 1980; Stier, C.T., 1980; Forsling, M.L., 1982; Garland, H.O., 1983; Conrad, K.P., 1986 & 1993; Verbalis, J.G., 1991; Brimble, M.J., 1991; Windle, R.J., 1995; Sjöquist, M., 1999) et le chien (Brooks, F.P. & Pickford, M., 1958; Chan, W.Y., 1961). Cependant, des études sur des rats Brattleboro, qui présentent un déficit génétique de synthèse d'AVP mais possèdent une voie vasopressinergique fonctionnelle, avaient observé un effet anti-diurétique de l'OT (Balment, R.J., 1980; Edwards BR & LaRochelle, F.T., 1984; Conrad, K.P., 1986). De la même façon, des études évaluant les effets rénaux de l'OT chez le rat (Soares, T.J., 1999) et le chien (Baird, S., 1958; Brooks, F.P., 1958; Andersen, S.E., 1992) avaient obtenu un résultat identique anti-diurétique.

Ces effets seraient, comme pour l'AVP, médiés par une stimulation par l'OT de récepteurs augmentant le taux d'AMPC intracellulaire (via V_2 ou autres récepteurs distincts peut-être) (Wargent, E.T., 1999), d'où l'effet anti-diurétique lors de

fortes concentrations, ou par des récepteurs augmentant le taux de Ca^{2+}_i (via R-OT, ou R-AVP ni- V_{1a} ni V_2 , ou via V_{1a} apparenté possiblement), d'où l'effet diurétique (Han, J.S., 1993) lors de faibles concentrations. Il a ainsi été démontré sur des reins de rat isolés que de hautes concentrations d'OT induisaient une vasoconstriction rénale inhibée par un antagoniste du V_{1a} mais pas par un antagoniste du récepteur OT (Loichot, C., 2001). Toutefois, l'affinité de l'OT pour ce récepteur V_{1a} fut trouvée faible dans cette même étude (voir aussi paragraphe 2.7.5). De plus, les effets anti-diurétiques de l'OT interviennent *via* les aquaporines-2 (Jeon, U.S., 2003). Ce dernier résultat a été reproduit chez l'homme (Joo, K.W., 2004).

Dans les études chez des sujets humains, malgré les controverses, il y a des évidences en faveur que l'OT produirait une action antidiurétique. Des cas d'intoxication à l'eau ont été répertoriés suite à l'administration d'OT par perfusion chez des femmes accouchant (Laversen, N.H., 1975), ce qui vient supporter l'hypothèse de son effet antidiurétique chez l'humain. Le mécanisme d'action de cet effet reste à être clarifié cependant, l'action antidiurétique de l'OT serait associée avec une excrétion accrue d'aquaporine-2 (Joo, K.W., 2004).

Chez l'humain, l'effet anti-natriurétique, anti-kaliurétique et antidiurétique de l'OT (à des doses physiologiques) a été observée également par une équipe de chercheurs Danois (Rasmussen, M.S., 2004) et ces effets ne seraient pas médiés par le système rénine-angiotensine-aldostérone, ni par des processus qui augmentent l'excrétion urinaire des métabolites du NO, comme le fait OT suite à la liaison de son récepteur au niveau rénal. Cette étude n'a pas permis de déterminer la provenance de l'effet, via le récepteur OT ou celui de l'AVP V_2 (Rasmussen, M.S., 2004) ou un autre récepteur non encore découvert. Aussi, l'effet natriurétique et diurétique/antidiurétique de l'OT apparaît être spécifique à l'espèce animale étudiée tel qu'également noté par Rasmussen *et al.* (2004) (Tableau II).

Tableau II. Effets observés sur la natriurèse et la diurèse chez diverses espèces animales suite à différents modes d'administration d'ocytocine.

Espèce	Anesthésié (A) ou Conscient (C)	Administration de l'OT	Effet natriurétique	Effet diurétique ou antidiurétique	Effet sur le TFG	Référence
Rats	C	CRI <i>s.c.</i>	Natriurèse	nd	↑	Conrad, K.P., 1993
Rats Brattleboro (diabète insipide)	C	CRI, 1 heure <i>s.c.</i>	Natriurèse	Anti-diurèse (à haute dose d'OT ≥ 1 UI seulement)	↑	Conrad, K.P., 1986
Rats	A et C	CRI <i>i.v.</i>	Natriurèse kaliurèse	Diurèse	↑	Sjöquist, M., 1999; Forsling, M.L., 1994
Rats	A	Bolus pulsatiles <i>i.v.</i>	Absence d'effets	Diurèse	nd	Sjöquist, M., 1999
Rats	C	CRI, Chronique <i>s.c.</i> dose physiologique	Natiurèse (la première journée seulement)	Absence d'effet	nd	Verbalis, J.G., 1991
Rats	C	CRI <i>i.v.</i>	Natriurèse	Diurèse	↑ (haute dose)	Forsling, M.L., 1982 et Windle, R.J., 1995
Rats Brattleboro (sans AVP endogène)	A	CRI, 20 min <i>i.v.</i>	Natriurèse	Anti-diurèse	nd	Balment, R.J., 1980
Rats	C	Bolus <i>i.v.</i>	Natriurèse Kaliurèse	Anti-diurèse	Aucun effet	Soares, T.J., 1999
Chiots hyperosmotiques	A	CRI <i>i.v.</i>	Natriurèse	nd	nd	Kleinman, L.L., 1980
Chiens	C	CRI <i>i.v.</i>	Natriurèse	Anti-diurèse	nd	Andersen, S.E., 1992
Chien	C	Bolus <i>i.v.</i>	Natriurèse Kaliurèse	Anti-diurèse	nd	Baird, S., 1958, Brooks, F.P., 1958
Chien	C	Bolus <i>i.v.</i>	Natriurèse Kaliurèse variable	nd	nd	Chan, W.Y., 1961
Homme (en diète hyposodée)	C	CRI <i>i.v.</i>	Antinatriurèse Antikaliurèse	Anti-diurèse	Aucun effet	Rasmussen, M.S., 2004
Homme (en diète sodée 10mmol/jour)	C	CRI, 1 heure <i>i.v.</i> dose physiologique	Natriurèse	Anti-diurèse	Aucun effet	Kostoglou-Athanassiou, I., 1994

Légende : CRI : perfusion continue ; *i.v.* : intraveineux ; *s.c.* : sous-cutané ; nd : non déterminé.

TFG : Taux de filtration glomérulaire. 1UI=1,71 μ g.

2.9. Pharmacodynamie de l'ocytocine sur la fonction cardiovasculaire

2.9.1. Effets *ex vivo* de l'ocytocine sur le tonus vasculaire

2.9.1.a. Études sur la vascularisation isolée.

Des études *ex vivo* chez le rat ont montré un effet vasoconstricteur de l'OT pour plusieurs types de vaisseaux isolés tels que l'aorte thoracique, les artères utérine, mésentérique (Miller, M.E., 2002), splanchnique et hépatique, mais ce sont les artères et veines ombilicales qui montrent le plus de sensibilité envers l'OT dans son effet vasoconstricteur (Altura, B.M. & Altura, B.T., 1984; Chen, Y.L., 1999) tandis que l'artère carotide ne répond pas à l'OT (Vedernikov, Y.P., 2006). L'OT provoque également la contraction de l'artère utérine humaine avec ou sans endothélium et ce, avec la même puissance et intensité (Jovanovic, A., 1997). Cependant, un effet vasodilatateur a été documenté avec des artères cérébrales chez le chien (Suzuki, Y., 1992) et l'artère fémorale chez l'humain (Tagawa, T., 1993). Ainsi, dépendant du type et du tonus vasculaire ainsi que de l'espèce animale étudiée, l'OT peut produire une vasoconstriction ou une vasodilatation (Altura, B.M. & Altura, B.T., 1984) mais la vasoconstriction est la plus souvent observée.

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents, des études *in vitro* et *ex vivo* ont utilisé des antagonistes spécifiques des récepteurs de l'OT, mais également des antagonistes des récepteurs de l'AVP puisque les deux peptides possèdent une grande similarité structurelle et puisque l'AVP est un vasoconstricteur puissant. Par ailleurs, puisque des récepteurs de l'OT et de l'AVP sont présents au niveau de l'endothélium vasculaire (Chen, Y.L., 1999; Miller, M.E., 2002) ainsi qu'au niveau des muscles lisses vasculaires (artères mésentérique, utérine, fémorale, aorte thoracique) (Stam, W.B., 1998; Chen, Y.L., 1999; Jankowski, M., 2000), des études ont regardé si la présence de l'endothélium pouvait également moduler la réponse contractile sur le tonus vasculaire. Il était proposé que la liaison de l'OT à ses récepteurs présents sur l'endothélium vasculaire serait responsable de la vasodilatation *via* la relâche de NO (Thibonnier, M., 1999; Jankowski, M., 2000), tandis que la liaison aux récepteurs du muscle lisse serait responsable de la

vasoconstriction *via* l'augmentation des concentrations de Ca^{2+} (Yazawa, H., 1996). Or, une étude ayant utilisé l'artère utérine humaine a conclu que l'OT induit une contraction qui n'est pas modulée par l'endothélium, mais que l'OT agit comme un agoniste partiel du récepteur V_{1a} sur ce tissu (Jovanovic, A., 1997). En effet, par sa similarité structurelle avec l'AVP, l'OT peut lier également les récepteurs de l'AVP (sous-type V_{1a}), entraînant une vasoconstriction. D'autres études *ex vivo* ont trouvé la même implication de l'OT avec le récepteur V_{1a} dans différents vaisseaux: l'OT est un agoniste partiel de ce récepteur (Vedernikov, Y.P., 2006) et produit un effet vasoconstricteur *via* V_{1a} (Chen, Y.L., 1999; Petersson, M., 1999; Loichot, C., 2001; Miller, M.E., 2002) lorsque présent en forte concentration ($>10^{-8}$ M) (Loichot, C., 2001). En effet, la réponse vasoconstrictrice se voit entièrement inhibée par un antagoniste spécifique du récepteur V_{1a} tandis qu'elle ne l'est pas par un antagoniste du récepteur de l'OT, ce qui indique l'implication du récepteur V_{1a} dans la réponse vasoconstrictrice de l'OT (Chen, Y.L., 1999; Loichot, C., 2001; Miller, M.E., 2002). Ainsi, l'OT aurait un effet indirect plutôt que direct dans la régulation de la résistance périphérique. Cependant, une étude a comparé les ratios des EC_{50} de l'OT et de l'AVP en absence et en présence de leur agoniste au niveau de l'artère utérine de rat. Ils ont conclu que l'OT et l'AVP contractent le tissu en activant leur récepteur respectif, mais qu'il est possible qu'il se produise également une activation croisée, vue leur homologie structurelle (Vedernikov, Y.P., 2006). Ainsi, il serait possible que l'OT puisse induire sur un lit vasculaire donné, une réponse vasodilatatrice (*via* la stimulation de la e-NOS, libération de NO et génération du GMPc) ou une réponse vasoconstrictrice (*via* la stimulation directe des récepteurs OT ou V_{1a} des muscles lisses vasculaires). De plus, la réponse est grandement modulée selon la densité d'expression des récepteurs concernés, variant avec le lit vasculaire concerné (les artères utérines sont très riches en R-OT) et l'imprégnation oestrogénique de l'animal (voir paragraphes 2.9.2 et 2.9.3), ainsi que la dose d'OT administrée.

2.9.1.b. Études sur cœur isolé.

Il a été récemment trouvé que le cœur et les gros vaisseaux sanguins tels que l'aorte sont un lieu de synthèse d'OT et que des récepteurs OT y sont également

présents (Jankowski, M., 1998; Gutkowska, J., 2000; Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001). L'équipe du Dre. Gutkowska a observé que la perfusion d'OT (10^{-6} M) dans des préparations de cœur isolé de rat en bain d'organe résulte en des effets inotropes et chronotropes négatifs doses dépendants qui seraient médiés par les récepteurs OT cardiaques. L'ajout d'un antagoniste de l'OT inhibe complètement la réponse sur la force et la fréquence des contractions cardiaques causée par l'OT, ce qui démontre la spécificité de la liaison au récepteur OT cardiaque. Également, l'ajout d'un inhibiteur de la NOS, le L-NAME, a eu le même effet sur l'inhibition de la réponse, ce qui supporte l'hypothèse que l'activation de la NOS serait impliquée dans cette action. En effet, le NO produit active l'enzyme guanylate cyclase soluble, ce qui provoque une augmentation en GMPc et par le fait même, contribue à diminuer la force de contraction (Mukaddam-Daher, S., 2001). Tel que discuté précédemment au paragraphe 2.8.6, l'OT relâchée au niveau neurohypophysaire en réponse à une augmentation de la volémie induit la relâche d'ANP cardiaque suite à la liaison de l'OT à son récepteur cardiaque mais également, l'OT produite au niveau cardiaque stimule également cette relâche. Ainsi, l'OT agit de manière endocrine et paracrine sur la relâche d'ANP qui exerce, par la suite, des effets inotropes et chronotropes négatifs sur le cœur *via* l'activation de la guanylate cyclase particulée et génération de GMPc (Favaretto, A.L.V., 1997; Gutkowska, J., 1997) et pourrait contribuer également à exercer une vasodilatation périphérique (Gutkowska, J., 2000). Ceci complèterait dès lors au niveau cardiaque les inter-relations précédemment décrites (Haanwinckel, M.A., 1995; voir paragraphe 2.8.6) entre l'ANP et l'OT au niveau rénal.

Une étude effectuée à la même époque, par un autre groupe ayant utilisé des cœurs de rats perfusés, avait également observé l'effet chronotrope négatif de l'OT (Coulson, C.C., 1997), mais les répercussions sur la contractilité et la pression ventriculaire gauche de fin de systole étaient opposés, marquées par un effet inotrope positif dose-dépendant. Finalement une étude récente a confirmé les effets chronotrope et inotrope négatifs de l'OT sur cœur isolé de rat (Costa-e-Sousa, R.H., 2005). Exposés à une concentration de 10^{-6} M d'OT, les cœurs ont présenté une baisse de 25% de la pression ventriculaire gauche de fin de systole, et de 20% de l'indice de contractilité dP/dt_{max} . Des baisses respectives de 60% et

45% ont été observées à la concentration de 10^{-5} M et seule cette concentration a eu un effet chronotrope négatif significatif. Les concentrations plus basses d'OT (10^{-10} à 10^{-8} M) n'ont eu aucun effet. Ces résultats ont aussi été reproduits *in vivo* chez la même espèce, le rat (Costa-e-Sousa, R.H., 2005).

2.9.2. Effets *in vivo* de l'ocytocine sur la fonction cardiovasculaire

Chez l'humain, l'OT est utilisée en obstétrique comme agent vasoconstricteur pour diminuer les pertes sanguines suivant une césarienne, un curetage abortif au premier trimestre, ou lors d'une hémorragie après la délivrance, par injection d'un bolus *i.v.* (5 à 10 UI ou 8,5 à 17,1 μ g), puisque les contractions utérines qu'elle engendre contribuent à la compression des vaisseaux sanguins et au décollement du placenta (Association des pharmaciens du Canada, 1998; Charbit, B., 2004). Cependant, il est depuis longtemps connu que suivant son administration par bolus *i.v.*, il peut en résulter une hypotension (baisse de 30% de la pression artérielle systémique et de 50% des résistances vasculaires systémiques) de courte durée accompagnée d'une augmentation de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique ventriculaire, autant chez des hommes que chez des femmes enceintes ou non (Mayes, B.T., 1956; Hendricks, C.H., 1970; Johnstone, M., 1972). Cette diminution de la pression artérielle systémique fut même plus prononcée chez la femme non enceinte comparativement à la femme enceinte (Brotanek, V., 1965). Le même effet sur la pression artérielle systémique (baisse liée à la vasodilatation induite par l'OT), la fréquence cardiaque (stimulation par baroréflexe mis en jeu suite à la baisse de pression artérielle systémique moyenne) et le débit cardiaque (hausse liée à l'effet chronotrope positif du baroréflexe et un possible effet inotrope positif a également été proposé) a été observé chez le chien suite à son administration en bolus *i.v.* (Nakano, J., 1963). Chez des patients hypovolémiques, une hypotension profonde a été répertoriée suite à l'administration d'OT (Charbit, B., 2004; Royal London College of Obstetricians and Gynecologists, 2001).

À l'opposé, une hypotension et une expansion du volume extracellulaire ont conduit à une stimulation des neurones ocytocinergiques et à une libération d'OT

(Fenelon, V.S., 1993; Haanwickel, M.A., 1995; Schiltz, J.C., 1997). Des études chez le rat conscient ont observé une augmentation de la pression artérielle systémique suivant son administration en bolus *i.v.* (1 µg, rats mâles avec une hausse de 22% = $+23 \pm 3$ mmHg; (Costa-e-Sousa, R.H., 2005) et même *s.c.* (1 mg/kg, rats femelles avec une hausse de +60-80 mmHg (Petersson, M., 1999). Les auteurs ont remarqué que la durée de cet effet hypertenseur était limité (moins de 5 min après l'injection *i.v.* et entre 30-40 min après l'injection *s.c.*) et également qu'il était associé à une diminution de la fréquence cardiaque : baisse de 20% = -69 ± 14 bpm dans la minute suivant l'injection *i.v.* (Costa-e-Sousa, R.H., 2005) et -70 bpm, 20-40 min après l'injection *s.c.* (Petersson, M., 1999) ainsi que de la force de contractilité cardiaque (-15% pour l'indice dP/dt) (Costa-e-Sousa, R.H., 2005). Par ailleurs, l'effet chronotrope négatif résulte de l'effet hypertensif de l'OT qui serait médié par le récepteur V_{1a} , puisque que l'utilisation d'un analogue d'OT sans affinité pour les récepteurs V_{1a} n'a pas reproduit l'effet hypertenseur de 10 µg d'OT administré *i.v.* sur rats mâles conscients (Petty, M.A., 1985) et qu'un prétraitement avec un antagoniste V_{1a} abolit l'augmentation de la pression artérielle systémique de même que la réduction de fréquence cardiaque, ce qui supporte les données *ex vivo* (Costa-e-Sousa, R.H., 2005). Cette diminution de la fréquence cardiaque *in vivo* dépasse l'inhibition attendue du système sympathique subséquente au baroréflexe engendré par l'augmentation de la pression artérielle systémique et il a aussi été démontré que l'OT amplifiait la réponse chronotrope négative du baroréflexe sur rats conscients (Russ, R.D., 1994). Enfin, il est à noter que ces effets hypertenseurs et chronotropes négatifs n'apparaissent pas lors d'utilisation préalable d'un antagoniste d'OT et qu'ils étaient plus marqués sur des rattes en oestrus et pro-oestrus, soit des périodes où les taux élevés d'œstrogène favorisent l'expression des récepteurs à OT (Petersson, M., 1999).

De plus, l'évaluation de souris *knock-out* pour l'OT a montré des fréquences cardiaques intrinsèques plus élevées, suggérant la participation d'un système ocytocinergique intracardiaque dans le contrôle de l'activité électrique cardiaque et elle a aussi confirmé le rôle de l'OT dans le baroréflexe (Michelini, L.C., 2003).

2.9.3. Variation des effets de l'ocytocine sur la pression artérielle systémique

Au niveau des effets de l'OT sur la pression artérielle systémique, une augmentation ou une diminution peut être observée dépendant de l'espèce animale (baisse chez le chien et l'Homme, hausse chez le rat et l'Homme), le sexe (des variations dans la durée de l'effet sur la pression ont été observées entre des rates et des rats), la dose et le site d'administration (l'hypertension a été observée lors d'injections *i.v.* et *s.c.*) et enfin, le temps d'observation (Tableau III).

En fait, il semblerait que l'on puisse appliquer aux modèles *in vivo* les mêmes hypothèses soulignées lors des études *ex vivo*. Ainsi, il serait possible que l'OT puisse induire sur un lit vasculaire donné une réponse vasodilatatrice (*via* la stimulation de la e-NOS, libération de NO et action du GMPc) ou vasoconstrictrice (*via* la stimulation directe des récepteurs à OT ou V_{1a} des muscles lisses vasculaires). De plus, la réponse est grandement modulée selon la densité d'expression des récepteurs concernés, variant avec le lit vasculaire concerné (artère utérine très riche en récepteurs à OT), la libération d'ANP associée à l'action de l'OT et l'imprégnation oestrogénique de l'animal, ainsi que la dose d'OT administrée.

Lors d'évaluation à long terme, Petersson et collaborateurs (1996) ont observé dans un premier temps un dimorphisme sexuel sur la durée de réponse : suite à l'injection *s.c.* quotidienne pour 5 jours (0,1 mg/kg ou 1 mg/kg) une baisse de la pression artérielle systémique systolique de 130 à 123 mmHg (soit une baisse légère sans aucune implication clinique) fut observée chez les femelles. La baisse était légèrement moindre et surtout temporaire (retour au niveau contrôle dans les 10 jours suivant la fin de l'administration d'OT) chez les mâles mais pas chez les femelles. De plus, l'absence d'effet sur la fréquence cardiaque ainsi que la similitude des réponses obtenues sur la pression artérielle systémique lors d'administrations répétées d'OT *s.c.* et *i.c.v.* suggèrent que l'effet cardiovasculaire de l'OT serait en partie régi au niveau central (Petersson, M., 1996). Il est connu que des neurones ocytocinergiques se projettent au niveau du SNC dans des régions impliquées entre autres dans la régulation cardiovasculaire (voir

paragraphe 2.6.3). Également, 0,2% d'une dose systémique d'OT peut passer la barrière hémato-encéphalique (Jones, P.M., 1982). Ainsi, l'administration répétée d'OT par la voie *s.c.* (1 mg/kg) engendre possiblement des concentrations systémiques suffisantes pour passer la barrière hémato-encéphalique et rejoindre le SNC pour y exercer les mêmes effets que ceux obtenus *via* l'administration *i.c.v.* (1 µg/kg) (Petersson, M., 1996). Par ailleurs, l'injection intrathécale (*i.t.*) d'OT (1,6 µg/kg) n'occasionne aucun changement hémodynamique, chez le chien anesthésié (Neath, P.J., 2000).

Par la suite, l'équipe de Petersson et collaborateurs (1999) a testé des injections répétées quotidiennes sur 5 jours consécutifs de la dose de 1 mg/kg d'OT *s.c.* sur des rattes intactes. Elle a observé une baisse de la pression artérielle systémique systolique de $132 \pm 1,8$ mmHg à $123 \pm 1,5$ mmHg (pression artérielle systémique moyenne de $122 \pm 2,6$ mmHg à $105 \pm 4,6$ mmHg) sans changement de la fréquence cardiaque, soit une reproduction des effets observés de leur étude antérieure (1996). Cette baisse de pression artérielle systémique dura 3 semaines et ne fut pas contrée par un pré-traitement avec un antagoniste de l'OT, contrairement aux effets observés lors d'administration aiguë. De plus, des rattes ovariectomisées soumises au même régime expérimental ont montré une baisse moindre de la pression artérielle systémique (de $132 \pm 2,3$ à 120 ± 3 mmHg pour la systolique), sans modification de la fréquence cardiaque et pour une durée moindre, seulement de 8 jours suite à la dernière administration d'OT. L'extension de la durée de traitement de 5 à 12 jours, toujours sur des rattes ovariectomisées, a résulté en une baisse similaire (de $129 \pm 0,9$ à $118 \pm 1,7$ mmHg pour la systolique) visible dès la huitième injection *s.c.* de 1 mg/kg (Petersson, M.A., 1999). Puisque l'effet durable n'est pas renversé par un antagoniste du récepteur à l'OT utérin, ceci supporte l'hypothèse que la diminution de la pression artérielle systémique s'effectuerait *via* un autre type de récepteur que le récepteur OT classique (utérin) (Petersson, M., 1999).

Tableau III. Effets cardiovasculaires observés chez diverses espèces animales suite à différents modes et dosages d'administration d'ocytocine

Espèce	Anesthésié ou Conscient (A / C)	Administration de l'OT Bolus ou CRI; Chronique; <i>s.c., i.c.v., i.v. ou i.t.</i>	Effet inotrope + ou -	Effet chronotrope + ou -	Effet sur la PAS moyenne ou systolique (↑ ou ↓)	Référence
Rats ♀ en proestrus	C	Bolus <i>s.c.</i> , 1 mg/kg	nd	- 20 à 40 min post injection	↑ PAS 60% immédiate 20-30 min post injection	Petersson, M., 1999
Rats ♂	C	Bolus <i>i.v.</i> , 1 µg	↓ 15% dP/dt	- retour au niveau basal 5 min post injection	↑ PAM 22%	Costa-e-Sousa, R.H., 2005
Rats ♀	C	Bolus <i>die</i> chronique, <i>s.c.</i> , 1 mg/kg	nd	Aucun effet	↓ PAS 13% persiste 3 sem post-tx	Petersson, M., 1999
Rats ♀ et ♂	C	Bolus <i>die</i> chronique <i>s.c.</i> , <i>i.c.v.</i> 1 mg/kg et 1 µg/kg	Aucun effet	Aucun effet	↓ PAS 10% persiste 3 sem post-tx <i>i.c.v.</i> chez la ♀	Petersson, M., 1996
Chien	A	Bolus <i>i.v.</i> 0,5 UI/kg	+	+	↓ PAM post injection après une première dose seulement	Nakano, J., 1963
Chien	A	Bolus <i>i.v.</i> 10 et 100 mUI/kg	nd	- non significative	↑ PAM mais non significative	Tran, L.D., 1982
Chien	A	Bolus <i>i.c.</i> 1 et 10 mUI/kg	nd	+ non significatif	↑ PAS et PAD surtout	Tran, L.D., 1982
Chien	A	Bolus <i>i.t.</i> , 1,6 µg/kg	Aucun effet	Aucun effet	↑ PAM non significative	Neath, P.J., 2000
Chat	A	Bolus <i>i.c.v.</i> 0.5 à 1.5 UI	nd	nd	↓ PAM à faible dose et ↑ PAM à haute dose (≥1UI)	Nashold, B.S., 1962

Légende : CRI : perfusion continue ; *i.v.* : intraveineux ; *i.c.v.* : intra-cérébroventriculaire ; *i.t.* : intrathécal ; *i.c.* : intra-cisternal ; *s.c.* : sous-cutané ; nd : non déterminé. 1 UI = 1,71 µg OT.

2.9.5. Effets de l'ocytocine sur la différenciation cellulaire des cardiomyocytes et sur l'organogénèse

L'OT aurait des propriétés intéressantes à explorer en remodelage cardiovasculaire :

- Prolifération de cellules endothéliales
- Différenciation de cellules souches embryonnaires en cardiomyocytes

En effet, une étude a observé que l'OT produit un effet prolifératif sur les cellules endothéliales vasculaires. En fait, les auteurs ont conclu que les récepteurs OT de l'endothélium ont des propriétés trophiques pouvant participer à la maintenance de l'intégrité du réseau vasculaire et que son action mitogénique nécessite l'interaction d'autres peptides vasoactifs (Thibonnier, M., 1999).

Par ailleurs, l'équipe du Dr. Paquin (Paquin, J., 2002) a montré que l'hormone possède la capacité de différencier des cellules souches murines embryonnaires P19 en cardiomyocytes battants qui expriment de l'ARN messager d'ANP. Il a également été reporté que les cellules Sca-1 positives (cellules souches adultes antigéniques), isolées du cœur de souris adulte, lorsque traitées avec de l'OT, pouvant exprimer des gènes de facteurs de transcription cardiaques et de protéines contractiles, présentaient une structure sarcomérique et pouvaient battre spontanément (Matsuura, K., 2004). L'hormone serait impliquée en cardiogénèse mais les voies de signalisation restent encore à être élucidées.

Enfin, l'OT semble avoir une influence sur le développement du cœur, en organogénèse, puisqu'une étude récente a trouvé que le système OT / récepteur OT cardiaque est exprimé à des taux plus élevés chez le fœtus que chez le nouveau né et encore plus que chez l'adulte (Jankowski, M., 2004).

2.10. Pharmacocinétique de l'ocytocine

2.10.1. Utilisation et administration chez l'humain

L'ocytocine est depuis longtemps utilisée en obstétrique pour l'induction des contractions utérines, pour augmenter leur force, pour réduire les hémorragies post-partum. Cette hormone est également nécessaire pour stimuler l'éjection du lait en lactation. Les données pharmacocinétiques existantes sont surtout disponibles dans le domaine de l'obstétrique (Association des pharmaciens du Canada, 1998).

L'administration d'OT sous forme de perfusion à débit constant, commençant par une dose initiale de 0.5 à 1.0 mU/min (0,85 à 1,71 ng/min), est suivie d'augmentations de 1 mU/min (1,71 ng/min) aux 40 à 60 minutes. Cette méthode correspond à la technique recommandée lors de l'induction du travail. Ces recommandations sont basées sur une étude pharmacocinétique réalisée chez 11 patientes au début des années 80 (Seitchik, J., 1984). Cette étude a trouvé qu'à ce taux de perfusion, il se produit une augmentation linéaire des concentrations plasmatiques (Cp) d'OT et 40 minutes en moyenne étaient nécessaires pour atteindre l'état d'équilibre des Cp. Cette découverte suggère que l'augmentation des doses avant cet intervalle de temps entraîne l'exposition inutile de la patiente à de plus hautes doses que nécessaire. Il est à noter que les concentrations périphériques d'OT ne reflètent pas la réponse utérine ni la progression du travail, ainsi, aucune corrélation n'a été trouvée entre l'augmentation des Cp d'OT administrée et la réponse (augmentation des contractions) (Perry, R.L., 1996). Pourtant, certaines publications ont utilisé de plus hautes doses d'OT et ont associé leurs résultats avec une diminution de césariennes effectuées (O'Driscoll, K., 1984).

L'administration pulsatile d'ocytocine lors de l'accouchement, dans le but de ressembler le plus possible à la réalité physiologique, a résulté en une moins grande quantité utilisée d'OT comparativement à la méthode par perfusion à débit constant (Cummiskey, K.C., 1989).

Ainsi, il existe encore une controverse sur "la meilleure méthode" à employer pour l'induction du travail et ce, malgré plusieurs années d'utilisation.

2.10.2. Notions élémentaires de pharmacocinétique

La pharmacocinétique est l'étude du devenir d'un médicament dans l'organisme. On peut décrire ce processus par l'ADME : Absorption, distribution, métabolisme et élimination. Ce sont toutes les phases par lesquelles une molécule ou principe actif (PA) doit cheminer ; c'est en quelque sorte son destin. Les processus d'absorption, distribution et élimination déterminent la vitesse et la durée qu'un PA se présente à sa cible (Rowland, M. & Tozer, T.N., 1995; LeBlanc, P-P., 1997). La pharmacocinétique s'intéresse donc à la relation dose-concentration dans le temps tandis que la pharmacodynamique s'intéresse à la relation dose-effet d'une molécule (Rowland, M. & Tozer, T.N., 1995; LeBlanc, P-P., 1997).

2.10.2a. Absorption

L'absorption est l'ensemble des phénomènes qui conduisent à l'apparition du PA dans la circulation sanguine après une administration. Pour ce faire, le PA doit traverser différentes barrières, selon le mode d'administration de la substance. Cela regroupe les phases biopharmaceutiques, lesquelles décrivent les étapes de mise en solution du PA à partir de sa forme pharmaceutique incluant sa désintégration, sa désagrégation puis sa dissolution (LeBlanc, P-P., 1997). Dans un contexte purement pharmacocinétique, le terme absorption désigne le passage à travers une membrane (Prescott, L.F., 1981; LeBlanc, P-P., 1997). Son absorption dépend donc de la route d'administration (entérique ou parentérale), dépend de plusieurs propriétés physico-chimiques de la molécule, elle dépend également de la surface d'absorption à laquelle le PA est exposé et de la vascularisation de cette région (Prescott, L.F., 1981; LeBlanc, P-P., 1997). La voie parentérale (*i.v.*, *i.m.*, *s.c.*, inhalation, dermique, sub-linguale, rectale) est utilisée lorsqu'un effet systémique est désiré. La voie entérique (orale) a la particularité de subir un effet de premier passage hépatique, c'est-à-dire qu'une fraction de la dose administrée se voit éliminée ou métabolisée par les enzymes hépatiques, lors de son passage à travers la circulation mésentérique, avant de se rendre jusqu'à la circulation systémique. Les autres voies telles qu'intra-

articulaire et épidurale sont utilisées lorsqu'une action circonscrite est désirée (Rowland, M. & Tozer, T.N., 1995).

L'absorption fait appel à une première notion de pharmacocinétique, soit la biodisponibilité (F), ou disponibilité physiologique (Wagner, J.G., 1975; LeBlanc, P-P., 1997). La biodisponibilité représente : 1) la quantité relative du PA absorbé à partir d'une forme pharmaceutique qui atteint la circulation systémique; 2) la vitesse à laquelle se produit ce phénomène. La référence est la voie intraveineuse qui donne une biodisponibilité de 100% ou $F = 1$ car toute la fraction inchangée du PA rejoint la circulation systémique et ce, dès son administration. C'est pourquoi nous comparons toutes les autres voies d'administration d'un médicament avec la voie intraveineuse lorsque l'on souhaite étudier la biodisponibilité absolue (Wagner, J.G., 1975; LeBlanc, P-P., 1997).

2.10.2b. Distribution

Suite à l'absorption ou à l'administration du PA dans la circulation systémique, il peut alors diffuser dans les érythrocytes et les autres cellules sanguines ou se fixer plus ou moins fortement aux protéines plasmatiques. Le médicament sous sa forme libre, non liée aux protéines plasmatiques, quitte l'espace vasculaire pour diffuser dans l'espace extravasculaire, les tissus, où il ira se fixer plus ou moins fortement aux protéines extravasculaires du liquide interstitiel ou aux autres constituants tissulaires (Rowland, M. & Tozer, T.N., 1995; LeBlanc, P-P., 1997). Plusieurs facteurs peuvent influencer sur les caractéristiques de distribution des médicaments, dont la vitesse de présentation d'un médicament à un tissu donné. En effet, de manière générale, les organes les mieux perfusés reçoivent plus rapidement la substance et ce, en plus grande quantité pour ensuite faire place à une diffusion plus lente de la substance vers les autres tissus. Ensuite, les propriétés physico-chimiques et la nature des membranes à traverser ou des barrières (telles que la barrière hémato-méningée et la barrière placentaire), la liaison aux protéines plasmatiques et tissulaires sont également des facteurs affectant la distribution (Rowland, M. & Tozer, T.N., 1995; LeBlanc, P-P., 1997). Tous ces éléments présentent un potentiel pouvant moduler la réponse

pharmacologique et entraîner des pharmacocinétiques non linéaires ou doses-indépendantes (Gibaldi, M. & Perrier, D., 1982).

Les volumes apparents de distribution (voir section 2.10.4b.) d'un médicament sont des paramètres pharmacocinétiques qui reflètent l'ampleur de leur distribution dans l'organisme. C'est l'élément quantitatif de la distribution mais ne représente pas un volume réel d'un compartiment physiologique, sauf exception. Comme pour la biodisponibilité, il existe aussi un élément cinétique qui rend compte de la vitesse à laquelle un médicament se diffuse dans les tissus et retourne dans le sang (LeBlanc, P-P., 1997).

2.10.2c. Métabolisme et élimination

Toute substance étrangère (xénobiotique) introduite dans l'organisme est éliminée, plus ou moins rapidement, sous forme inchangée *via* une des voies d'excrétion (urine, fèces, bile, poumons autres liquides de l'organisme) et/ou sous forme changée par biotransformation *via* la conversion en métabolites (LeBlanc, P-P., 1997). La métabolisation des xénobiotiques en métabolites est le processus qui sert à rendre une molécule lipophile plus hydrosoluble (ou moins lipophile) afin de favoriser son élimination de l'organisme (LeBlanc, P-P., 1997). Cependant, les métabolites produits peuvent être inactifs, actifs ou réactifs.

La biotransformation ou métabolisation des drogues modifie la structure chimique par un système enzymatique endogène et se produit principalement au niveau hépatique mais également dans d'autres organes tels que le tractus gastro-intestinal, les reins et les poumons, etc. Les réactions enzymatiques sont classées en deux catégories : les réactions de phase I, ou biotransformation (oxydo-réduction et hydrolyse) et les réactions de phase II, ou conjugaison. Lorsqu'une drogue ou un xénobiotique subit les réactions de phases I et II, il se transforme en métabolite qui peut être actif, inactif ou réactif (Rowland, M. & Tozer, T.N., 1995; LeBlanc, P-P., 1997).

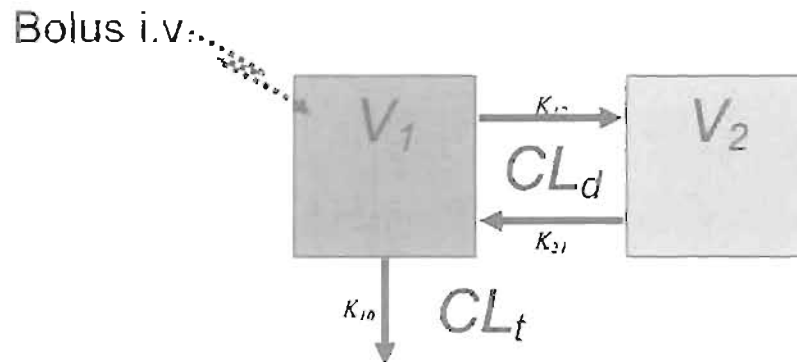
Les routes les plus importantes d'excrétion sont le système rénal et le système digestif. Les substances excrétées dans les fèces sont soit non absorbables, soit ont été ingérées par voie orale et passent tout droit, soit sont des métabolites excrétés

dans la bile ou sécrétés directement dans le tractus digestif et par conséquent, ne sont pas réabsorbés. Le rein est l'organe par excellence pour l'excrétion des drogues et de leurs métabolites. Trois processus sont impliqués lors de l'élimination rénale : la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire et la réabsorption tubulaire. Des changements dans la fonction rénale affectent le processus d'élimination. Également, les propriétés physico-chimiques de la molécule (taille, poids moléculaire, degré d'ionisation), leur liaison aux protéines plasmatiques ainsi que la présence de systèmes de transports sélectifs pour la molécule sont des facteurs qui modulent l'élimination rénale de la substance (Rowland, M. & Tozer, T.N., 1995; LeBlanc, P-P., 1997).

2.10.3. Modélisation pharmacocinétique

La pharmacocinétique est également définie par la description mathématique des changements de concentration de la drogue dans l'organisme. Elle utilise entre autre une approche par compartiments, qui sont des entités mathématiques plutôt que physiologiques (Gibaldi, M. & Perrier, D., 1982). Le modèle ouvert à deux compartiments décrit adéquatement la disposition de plusieurs drogues ou substances administrées par voie *i.v.* chez l'humain et l'animal, cependant, il ne permet pas d'identifier les organes ou les tissus appartenant à l'un ou l'autre des compartiments (LeBlanc, P-P., 1997).

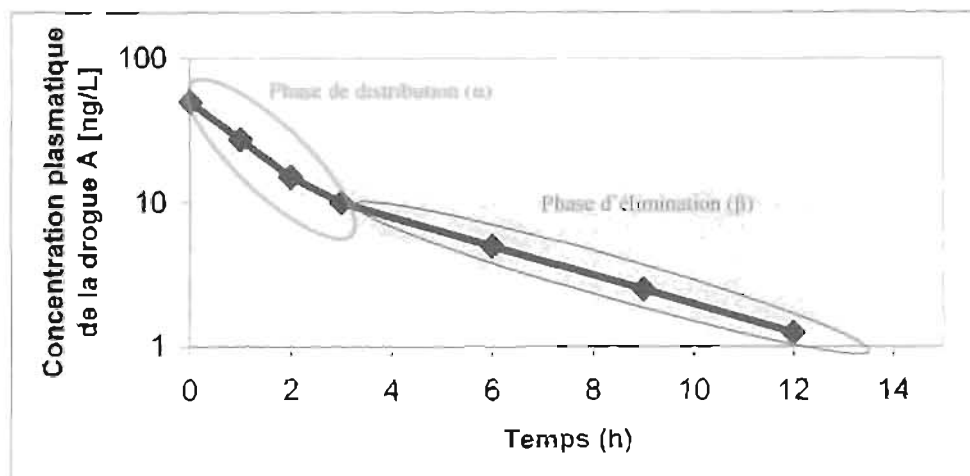
Figure 7. Modèle pharmacocinétique ouvert à deux compartiments



Légende explicative : V_1 ; compartiment central ou vasculaire, V_2 ; compartiment périphérique, CL_d ; clairance de distribution, CL_f ; clairance d'élimination, K_{12} et K_{21} ; microconstantes de distribution, K_{10} ; microconstante d'élimination.

Il est assumé que la drogue administrée directement par voie intraveineuse se distribue uniformément et instantanément dans le volume V_1 , le compartiment central ou vasculaire. Les tissus hautement perfusés (tels que les organes vitaux par exemple) peuvent s'équilibrer avec le compartiment central (Gibaldi & Perrier, 1982), cependant, ce n'est pas le cas pour le compartiment périphérique V_2 , pour lequel l'état d'équilibre est obtenu plus lentement. Dans ce cas, il est observé, lors de l'administration intraveineuse d'une drogue, que la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps ne diminue pas de manière linéaire tel un processus d'ordre un correspondant à un modèle à un compartiment. En effet, en regardant l'exemple de la Figure 8 avec la drogue A, une première phase rapide de distribution est observée jusqu'à l'atteinte de l'état d'équilibre, où est observé une pente plus lente, décrivant l'élimination. Ces taux de distribution différents entre les divers compartiments contribuent à l'apparition d'une courbe non linéaire qui peut être divisée en deux parties, lorsqu'on observe l'évolution des C_p en fonction du temps sur un graphique à échelle semi-logarithmique (LeBlanc, P-P., 1997; Gibaldi & Perrier, 1982). Cependant, suite à l'équilibre des concentrations parmi tous les compartiments (V_1 et V_2), nous observons que la courbe des variations C_p -temps reflète une phase d'élimination linéaire d'ordre un (Figure 8).

Figure 8. Courbe semi-logarithmique des concentrations plasmatiques en fonction du temps d'un modèle ouvert à deux compartiments divisée en deux parties ; la phase de distribution (α) et la phase d'élimination (β).



Les modèles à deux compartiments ouverts assument que l'élimination se produit à partir du compartiment central puisque les mécanismes d'élimination se produisent dans les organes les mieux perfusés (reins et foie), c'est pourquoi on les nomme ouverts.

2.10.4. Paramètres pharmacocinétiques

2.10.4a. La clairance totale (CL_t)

À partir de données expérimentales des variations de la C_p du médicament en fonction du temps, nous pouvons déterminer les paramètres pharmacocinétiques d'intérêt. D'abord, la clairance d'une molécule nous permet de définir le taux d'élimination de la substance. Par exemple, la clairance métabolique hépatique (CL_h) représente la vitesse de biotransformation par le foie divisée par la C_p à l'équilibre. Ainsi, le paramètre de la clairance peut s'appliquer à tous les organes d'élimination, c'est ainsi qu'il existe des clairances hépatique, rénale, pulmonaire, etc (LeBlanc, P-P., 1997). Cependant, la clairance totale ou systémique correspond à la sommation de tous les processus d'élimination du médicament dans le temps (d'origine hépatique, rénale ou autre) par rapport à la C_p restante en circulation, c'est donc une constante de proportionnalité. La clairance totale correspond au volume de liquide (plasma ou sang) complètement épuré par unité

de temps (LeBlanc, P-P., 1997; Shargel, L., 2005). Ainsi, en calculant l'aire sous la courbe de la variation des Cps du médicament en fonction du temps, nous obtenons un indice de l'exposition de l'organisme à la substance, de même que de sa disparition (Shargel, L., 2005). La clairance totale est exprimée mathématiquement comme suit :

Équation 1. Calcul de la clairance totale (CL_t)

$$CL_t = \text{Dose}/\text{AUC}$$

Où AUC est déterminée par le calcul de l'aire sous la courbe (AUC) des variations de la Cp du médicament en fonction du temps (Gibaldi & Perrier, 1982; Shargel, L., 2005).

2.10.4b. Le volume de distribution apparent (V)

Un autre paramètre d'intérêt est celui du volume de distribution apparent. Il est aussi une constante de proportionnalité car il relie la Cp et la dose administrée. Ainsi, il est un volume théorique qui ne peut pas donner d'information sur le volume d'un organe ou d'un fluide quelconque de l'organisme, mais donne plutôt une idée de l'étendue de la distribution du médicament. Ce paramètre est donc souvent mal interprété car en réalité, il faudrait aller mesurer exactement la concentration du médicament au site d'action pour pouvoir affirmer si la drogue s'y rend, même si elle présente un volume de distribution qui suggérerait cette hypothèse (Gibaldi & Perrier, 1982; Shargel, L., 2005). Nous calculons le volume de distribution apparent comme suit :

Équation 2. Calcul du volume de distribution apparent.

$$V = \text{CL}/\text{Dose} * \lambda z$$

Où V est le volume de distribution apparent, CL est la clairance et λz est la constante d'élimination déterminée par la pente de la courbe des variations de la Cp du médicament en fonction du temps. Seule la dose est le paramètre qui peut varier, les autres sont des constantes (Gibaldi & Perrier, 1982; Shargel, L., 2005).

2.10.4c. La demi-vie ($t_{1/2}(\lambda z)$)

Cette dernière équation nous permet d'obtenir un autre paramètre d'intérêt ; la demi-vie qui est le temps requis pour que la Cp du médicament chute de moitié lors de son élimination. Ce paramètre est utile pour calculer le temps requis pour atteindre l'état d'équilibre lorsqu'on prévoit une posologie à administration multiple (afin d'éviter les intoxications) mais également, pour connaître le temps requis pour que le médicament soit éliminé du site de mesure (Gibaldi & Perrier, 1982; Shargel, L., 2005).

Équation 3. Calcul de la demi-vie ($t_{1/2}(\lambda z)$)

$$t_{1/2}(\lambda z) = \ln(2) / \lambda z = \ln(2) * V / CL$$

Où $\ln(2)$ est le logarithme népérien de 2, V le volume de distribution apparent, CL la clairance totale et λz la constante d'élimination (Gibaldi & Perrier, 1982; Shargel, L., 2005).

2.10.7. Propriétés pharmacocinétiques de l'ocytocine chez l'humain

L'ocytocine peut être administrée par toutes les voies parentérales. Elle est bien absorbée par la muqueuse buccale et nasale (Seitchik, J., 1984). Lorsqu'administrée oralement, l'OT subit une destruction enzymatique lors de son passage dans le tractus gastro-intestinal par la trypsine. Une fois absorbée, l'OT est distribuée dans le volume extracellulaire et ne se lie pas aux protéines plasmatiques (Fernando, A., 2000). L'OT est métabolisée par le foie et les reins. Seule une petite fraction inchangée se voit excrétée dans l'urine (Seitchik, J., 1984).

La demi-vie plasmatique de l'OT est de quelques minutes, plus précisément des valeurs de demi-vie variant de 10 à 12 minutes ont été rapportées, mais l'auteur ne spécifie pas si ces valeurs sont retrouvées chez la femme non enceinte ou autre (Fernando, A., 2000). En effet, une autre étude révèle un temps de demi-vie plasmatique de 5 min chez la femme enceinte (Seitchik, J., 1984).

Tableau IV. Les concentrations basales d'ocytocine endogène chez l'humain.

Sexe	Concentration plasmatique d'ocytocine (pg/mL)
Homme ¹	< 3
Femme enceinte ² à terme	21,2 ± 0,9

Légende : ¹ De Groot, A., 1995; ² Perry, R.L., 1996.

Après une administration intraveineuse (1 UI ou 1,71 µg) chez l'homme, la pharmacocinétique de l'OT peut être décrite par un modèle à deux compartiments, avec les paramètres suivants (De Groot, A., 1995) :

Tableau V. Paramètres pharmacocinétiques de l'ocytocine chez l'humain.

Paramètre	Unités	Moyenne ± erreur type
$t_{1/2a}$; phase de distribution	Min	2.94 ± 0,96
$t_{1/2b}$; phase d'élimination	Min	19,8 ± 13,8
CL _t ; Clairance totale	L·hr ⁻¹	67,1 ± 13,4
V ₂ ; Volume de distribution	L	33,2 ± 28,1
V _{ss} ; Vol. dist. à l'équilibre	L	12,2 ± 5,6

D'autres études ont rapporté les valeurs suivantes de clairance et n'ont pas obtenu des taux statistiquement différents entre les hommes, femmes enceintes et femmes non enceintes (Tableau VI):

Tableau VI. Clairance systémique de l'ocytocine chez l'homme et la femme.

Caractéristiques de l'échantillonnage	Clairance (mL/kg/min)
femmes primipares en contraction ¹	17,3 ± 2,4 (soit ~67 L·hr ⁻¹)
homme ²	27 ± 1,8 (soit ~113 L·hr ⁻¹)
femme non enceinte ²	20,6 ± 2,8 (soit ~68 L·hr ⁻¹)
femme enceinte > 37 semaines ²	23,1 ± 2,6 (soit ~90 L·hr ⁻¹)

Légende : ¹ Seitchik, J., 1984; ² Leake, R., 1980.

2.10.8. Propriétés pharmacocinétiques de l'ocytocine chez l'animal

En médecine vétérinaire, l'OT est utilisée dans le traitement des rétentions placentaires, lors de la stimulation des contractions utérines en parturition et lors de la stimulation de l'éjection du lait en période de lactation. Les routes d'administration surtout utilisées sont les voies intramusculaires et intraveineuses.

Les valeurs de demi-vie de l'OT chez les animaux sont similaires à celles retrouvées chez l'humain (Tableau VII) :

Tableau VII. Temps de demi-vie plasmatique de l'ocytocine chez diverses espèces animales.

Espèce animale	Administration OT	Demi-vie (min)
Chèvre ¹	Bolus	1,94 ± 0,43 (distribution)
	<i>i.v.</i> 2 µg/kg	22,3 ± 0,6 (élimination)
Brebis ²	Bolus	1,3 (distribution)
	<i>i.v.</i> 3,4 ou 171 µg	
Rat ³	CRI pendant 30 min <i>i.v.</i> 0,043 ng/kg/min - 0,1 µg/kg/min	1,85 ± 0,55 (distribution)

Légende: ¹ Homeida, A.M., 1984, ² Al-Ekna, M.M. & Homeida, A.M., 1991 ; Fitzpatrick, R.J., 1961, ³ Fabian, M., 1969.

En ce qui concerne les autres paramètres PK, peu de données dans la littérature sont disponibles mais une étude réalisée chez le rat anesthésié au phénobarbital a obtenu les valeurs suivantes (Fabian, M., 1969), qui s'approchent également des valeurs retrouvées chez l'humain :

V_{ss} ; 7,3 mL/100g de poids corporel (soit ~18,25 L)

CL ; 2,4 mL/100g/min (soit ~60 L·hr⁻¹)

$t_{1/2\alpha}$; 1,85 min

Le volume de distribution apparent des concentrations à l'état d'équilibre obtenu par cette étude suggère que ce volume se situe entre celui équivalent au volume plasmatique (~ 3,4 ml/100g) et celui équivalent à l'espace extracellulaire (~ 11,8 ml/100g) (Fabian, M., 1969). Par ailleurs, les valeurs de demi-vie qu'ils ont obtenus correspondent à ceux obtenus par l'équipe de Ginsburg & Smith (1959) avec un temps $t_{1/2\alpha}$ de 1,65 min. À cette époque, ils ont conclu que l'OT était inactivée assez rapidement, malgré la forte dose administrée, probablement par l'implication de processus peu spécifiques d'élimination ou d'inactivation de l'hormone (Fabian, M., 1969). Une étude plus récente portant sur la pharmacocinétique d'analogues anti-utérotoniques de l'OT chez le rat a publié des valeurs de clairance et de demi-vie d'élimination de l'hormone, et nous observons que malgré la variation, ces résultats ressemblent encore à ceux obtenus chez l'humain (Lundin, S., 1993) :

Clairance systémique : $24,3 \pm 7,4$ mL/kg/min (soit ~102 L·hr⁻¹)

$t_{1/2\beta}$: $20,7 \pm 3,1$ min

Comme nous pouvons le constater, les études antérieures ne se sont pas attardées au modèle pharmacocinétique de l'OT et surtout peu de données sont disponibles, particulièrement aucune étude n'a évalué différentes doses. Toutefois, elles montrent l'intérêt de présenter peu de différences inter-spécifiques (humain, rat, brebis, chèvre).

2.11. Énoncé du problème, hypothèses et objectifs de recherche

Ce projet fait partie d'une vaste étude qui vise à développer une approche thérapeutique en utilisant l'OT pour des fins de régénération myocardique chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde. Nous suspectons que l'OT possède un index thérapeutique étroit en raison des effets cardiovasculaires et rénaux qu'elle exerce mais surtout, en raison de la population visée par ce traitement, soit des personnes à risque, présentant des complications, des problèmes cardiovasculaires, de l'hypertension, de l'athérosclérose, du diabète, etc. Ainsi, il est primordial d'éviter les toxicités reliées à l'administration de ce peptide. Il est donc impératif de pouvoir prédire les concentrations plasmatiques thérapeutiques et prédire les concentrations pouvant générer les effets adverses ainsi que les concentrations toxiques.

Par ailleurs, puisque l'OT :

- agit sur les fonctions rénales et cardiovasculaires, et que cette action pourrait affecter sa propre élimination par diminution de sa clairance rénale ;
- suit un processus d'élimination rénale ;
- a des effets sur ces mêmes fonctions variables d'une espèce à l'autre et également selon la dose administrée ;

Alors, notre hypothèse est que sa pharmacocinétique ne devrait pas suivre un modèle linéaire où les divers aspects du devenir du médicament dans l'organisme (ADME) sont des processus d'ordre un dont les constantes de vitesse sont indépendantes de la dose administrée. Par exemple, si les processus d'excrétion sont altérés à partir d'un certain dosage, alors cela affectera la clairance d'élimination du médicament et on parlera alors d'un cas de non-linéarité. De même, si le médicament n'est pas distribué dans un même volume de distribution pour chaque dose, alors on y retrouvera un cas de non-linéarité car aucune proportionnalité avec la dose ne sera conservée. Ainsi, lorsque la relation entre la dose absorbée et l'AUC des C_p en fonction du temps n'est pas linéaire, on parle

de PK non linéaire. Par ailleurs, il faut noter que la non-linéarité peut s'observer lorsqu'un processus d'absorption, de distribution ou d'élimination est modifié en fonction du temps et non en fonction de la dose. Dans ce cas, on parle de non-stationarité (LeBlanc, P-P., 1997).

Enfin, puisqu'il y a peu de données pharmacocinétiques disponibles dans la littérature chez le rat qui décrivent de manière approfondie de comportement PK de l'OT et puisque les données existantes ne tiennent pas compte de la possibilité d'une non-linéarité du modèle pharmacocinétique de l'OT, il est pertinent de caractériser le modèle pharmacocinétique / pharmacodynamique de l'OT chez le rat et d'autres espèces afin d'établir ultérieurement un régime posologique efficace et sécuritaire chez l'humain et éviter l'atteinte des toxicités. Nos objectifs de recherche sont de :

- Comparer les courbes des Cp d'OT en fonction du temps pour différentes doses administrées ;
- Vérifier quels paramètres PK (clairance, volume de distribution, $t_{1/2}$) changent éventuellement en fonction de la dose administrée ;
- Vérifier à partir de quelle(s) dose(s), ce(s) paramètre(s) change(nt) éventuellement ;
- Expliquer la cause de cette non-linéarité éventuelle en évaluant ses effets sur la fonction rénale (diurèse, natriurèse, kaliurèse).

CHAPITRE III

3.0. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux. L'expérimentation a été effectuée selon les normes du Conseil Canadien pour la protection des animaux avec l'approbation des comités d'éthique de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal et de l'entreprise LAB Research Inc. (Laval, QC, Canada) avant l'initiation des procédures expérimentales. Les expérimentations animales ont été effectuées chez LAB Research Inc. Les rats mâles Sprague-Dawley adultes (400-700g) utilisés dans cette étude provenaient des Laboratoires Charles River (St-Constant, QC, Canada).

Conditions de captivité. Les rats ont été gardés par groupe de 2 ou 3 par cage dans une chambre à température contrôlée (température $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$, humidité 30-70%, 12 h luminosité, 12 h noirceur, 10-15 changements d'air à l'heure) dans l'animalerie de l'entreprise LAB Research Inc. De la nourriture pour rongeurs de laboratoire (Laboratory rat chow Rodent Diet #2018C, Certifié 18% en protéine brute, Teklad, Madison, WI, USA) ainsi que de l'eau fraîche étaient disponibles *ad libitum*. Des os à gruger ainsi que des cylindres de plastique servant de cachettes leur étaient disponibles afin d'enrichir leur environnement et éviter l'ennui.

Anesthésie et monitoring. 9 groupes de rats mâles ($n \geq 4$) de 400-700 g ont été pesés à l'aide d'une balance numérique (Mettler Toledo Canada, Mississauga, ON, Canada) de précision de $\pm 0,001$ g et leur identification a été vérifiée. L'animal a été anesthésié d'abord dans une cage à induction avec de l'isoflurane et un véhicule d'oxygène dans un ratio de 3:97 respectivement. Ensuite, l'animal fut placé sur la table de chirurgie et son anesthésie a été maintenue par inhalation au masque avec de l'isoflurane et un véhicule d'oxygène dans un ratio de 2:98. Les animaux étaient maintenus sur un tapis chauffant (37°C) à circulation d'eau tempérée. L'animal a été stabilisé sur la table de chirurgie à l'aide de ruban adhésif de type Transpore[®] (3M, Ville St-Laurent, QC, Canada) sur chacun de ses membres inférieurs.

Figure 9. Pesée et identification des rats dans les locaux de LAB Research inc. (Laval, QC, Canada).



Installation d'un cathéter dans la veine caudale. Une aiguille de type papillon (25G) a été installée dans la veine caudale pour l'administration de l'OT et de la perfusion continue d'une solution lactate de Ringer. Afin de faciliter l'insertion du cathéter de type papillon dans la veine caudale, la queue a été préalablement réchauffée à l'aide d'une lampe infra rouge (Figure 10). Afin de compenser les pertes de fluides durant l'expérimentation, la fluidothérapie de lactate de Ringer a dès lors été démarrée et ce, pour le reste de l'expérimentation, en maintenant un débit de 10 mL/kg/hr à l'aide d'une pompe à perfusion (AS50, One Baxter Parkway, Deerfield, IL, USA) (Figure 11). Le cathéter papillon fut stabilisé à l'aide de ruban adhésif de type Transpore® (3M, Ville St-Laurent, QC, Canada).

Figure 10. Installation de cathéter de type papillon (25G) dans la veine caudale



Figure 11. Pompe à infusion de type AS50 pour le maintien de la fluidothérapie



Installation d'un cathéter dans la veine fémorale. Toute la région ventrale et inguinale a été rasée à l'aide d'une tondeuse Golden A5 (Oster, Montreal, QC, Canada) avec des lames de taille 40 (chirurgicales). Le site opératoire a été ensuite nettoyé avec une gaze d'alcool puis désinfecté aseptiquement en effectuant 3 répétitions de passages de gazes d'alcool et de chlorhexidine (en alternance). Une incision de 2,5 cm a été effectuée sur la peau au niveau de l'aîne gauche à l'aide d'une lame de bistouri numéro 10 stérile. Les tissus musculaires ont également été incisés avec précaution avec la lame de bistouri. La veine fémorale a été délicatement isolée à l'aide de pinces Iris courbées. Deux fils de suture Vicryl 3.0 (Johnson & Johnson, Montréal, QC, Canada) d'environ 15 cm ont été placés sous le vaisseau, à chaque extrémité de la section isolée, soit à environ 2 cm l'un de l'autre, une en position antérieure, l'autre en position postérieure. Un nœud plat lâche, non tendu, a été effectué sur chacun des fils afin de faciliter la stabilisation ultérieure du cathéter fémoral. Une pince hémostatique a été placée sur chaque fil afin de compresser chaque extrémité du vaisseau isolé en effectuant une légère tension (maintenue seulement par le poids de la pince) et ainsi, éviter une hémorragie lors de la cannulation. Le vaisseau isolé et compressé a été incisé en son milieu avec des ciseaux Vannaas de manière à couper les 2/3 du diamètre de la veine. Un cathéter MRE-040 (Braintree Scientific Inc, Braintree, MA, USA) d'environ 20 cm dont une extrémité a été coupée en biseau de 25-30°, a préalablement été rempli de saline héparinée (100 UI/mL) et son volume mort a préalablement été mesuré. Ensuite, le cathéter MRE-040 a été introduit dans la

veine fémorale, en direction antérieure, sur une longueur d'environ 3 à 5 cm puis ligaturé à la veine, avec le fil Vicryl 3.0 antérieur par 5 nœuds plats, après vérification de son bon fonctionnement à l'aide d'une seringue 1cc remplie de saline. La portion postérieure du vaisseau a été ligaturée complètement avec le deuxième fil.

Figure 12. Étude PK/PD chez le rat anesthésié



Cystocentèse de vidange vésical. La région ventrale de l'animal a été préalablement rasée et nettoyée avant d'effectuer la cystocentèse de vidange vésicale pour la collecte d'urine. Une incision abdominale de 3 cm a été pratiquée avec une lame de bistouri numéro 10 afin d'isoler la vessie. La ligne blanche, les muscles abdominaux et le péritoine ont été incisés puis la vessie fut isolée. Une aiguille de type papillon (25G) reliée à une seringue de 5cc a été placée dans la vessie pour les prises d'échantillon. Le volume mort du cathéter urinaire a été mesuré préalablement et le cathéter en place a été fixé à l'animal avec du ruban adhésif de type Transpore[®] (3M Ville St-Laurent, QC, Canada). La vessie fut complètement vidée juste avant l'administration d'OT ou d'ANP (5 µg/Kg) qui a servi de contrôle positif pour la natriurèse, la diurèse et la kaliurèse. La collecte d'urine s'est effectuée au dernier temps de prélèvement de l'étude PK (voir **Tableau VIII**).

Protocole expérimental PK/PD. Les traitements ont été assignés au hasard parmi 9 groupes de rats ($n \geq 4$). Les doses de 0, 200, 300, 500, 1000, 3000, 5000, 10000 ng·kg⁻¹ administrées en bolus *i.v.* ont été sélectionnées afin de déterminer le profil

pharmacocinétique du peptide. Le groupe contrôle ($0 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT) a reçu de la saline physiologique 0.9 % NaCl. Les doses de 300 et $1000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ furent sélectionnées en raison de l'absence d'effets cardiovasculaires observée à la dose de $300 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ lors d'une étude *in vivo* réalisée par l'équipe préalablement, dans un projet du Dr. Simon Authier. À partir de celles-ci, les autres doses de 3000, 5000 et $10000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ ont été sélectionnées pour tester notre hypothèse nulle de linéarité pharmacocinétique. Nous avons ajouté des doses intermédiaires de 200 et $500 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ afin de vérifier la reproductibilité du comportement PK de l'OT sous la dose de $1000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Concernant le protocole PD de cette étude, un groupe servant de témoin positif pour la natriurèse et la diurèse a reçu une dose de $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ d'ANP par bolus *i.v.*. Pour chaque groupe, excluant celui recevant de l'ANP, différents temps de prélèvement de sang ont été optimisés par Dr. Jérôme del Castillo suite à la modélisation PK des données obtenues lors de l'étude pilote en juillet 2004. Une solution d'OT dans la saline physiologique 0.9 % NaCl fut stérilisée par filtration *via* une membrane-filtre de $0.45 \mu\text{m}$ en polyethersulfone (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA), juste avant son administration aux animaux. La concentration d'OT à injecter a été ajustée de manière à obtenir un volume final constant de 1 mL pour injection. Ainsi, afin de quantifier les concentrations plasmatiques d'OT, 1 mL de sang a été prélevé (voir les temps de prélèvements décrits dans le **Tableau VIII**) dans des tubes vacuum (Vacutainer, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) contenant 1 mg/mL EDTA, un anticoagulant, enrichis de 10 mM de para méthyl sulfafuorure (PMSF, P7626; Sigma-Aldrich Chemical, Oakville, ON, Canada), et 5 mM pepstatine A (P4265; Sigma-Aldrich Chemical, Oakville, ON, Canada) afin de prévenir la dégradation du peptide. Les tubes remplis de sang ont été placés sur la glace humide (4°C) aussitôt la collecte effectuée. Après une centrifugation de 10 minutes à 3,000 rpm ($1500 \times g$), le plasma a été récolté et mis sur la glace sèche et fut conservé à -80°C jusqu'à l'analyse par radioimmunos dosage (RIA).

En ce qui concerne les prélèvements d'urine, la vessie a été complètement vidée juste avant l'administration de l'OT ou de l'ANP ($5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) et la quantité d'urine produite a été prélevée et mesurée à la fin de la procédure (voir **Tableau VIII**). Des aliquots de $500 \mu\text{L}$ d'urine ont été placés immédiatement sur la glace sèche et

conservés à -80°C jusqu'à l'analyse de la natriurèse et kaliurèse par photométrie de flamme, réalisée au Service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal.

Tableau VIII. Groupes de rats anesthésiés lors de l'étude PK/PD

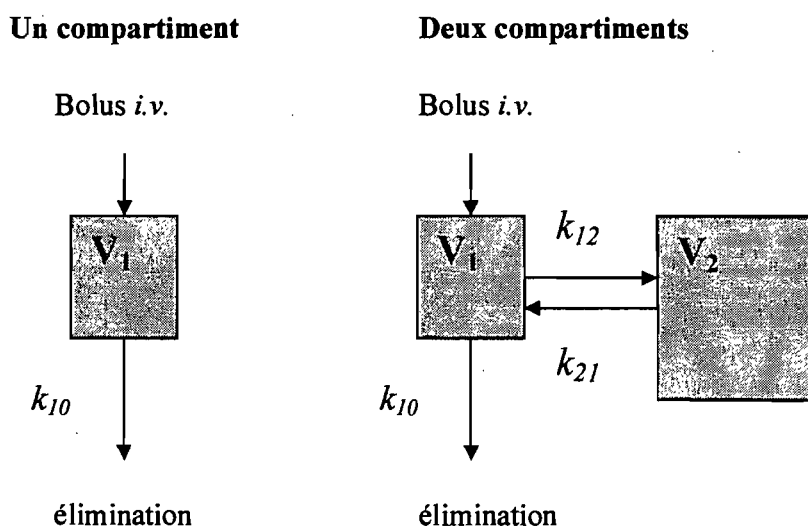
Drogue	Dose (ng/kg)	Voie	n	Temps prélèvements sang (min)	Temps prélèvements urine (min)
OT	0	<i>i.v.</i>	11	2, 4, 12, 30, 90 et 150	72, 120 ou 140
OT	200	<i>i.v.</i>	4	-20, 2, 6, 12 et 24	15
OT	300	<i>i.v.</i>	10	2, 4, 6, 36, 60 et 72	72
OT	500	<i>i.v.</i>	4	-20, 2, 6, 12 et 24	15
OT	1000	<i>i.v.</i>	4	2, 4, 6, 36, 60 et 72	72
OT	3000	<i>i.v.</i>	4	2, 4, 6, 36, 60 et 72	72
OT	5000	<i>i.v.</i>	9	4, 12, 30, 90, 120 et 150	150
OT	10000	<i>i.v.</i>	4	4, 12, 30, 90, 120 et 150	140
ANP	5000	<i>i.v.</i>	4	4, 12, 30, 80, 110 et 140	72

Euthanasie. À la fin de la procédure soit, dès le dernier temps de prélèvement achevé, l'animal anesthésié a été euthanasié par dislocation cervicale, puis la carcasse a été entreposée au congélateur (-20°C) jusqu'à son incinération.

Analyses. Les concentrations plasmatiques d'OT ont été déterminées par RIA. La technique de dosage de l'OT par RIA a été mise au point dans le laboratoire du Dre. Jolanta Gutkowska avec l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre le nonapeptide OT (généreux don de Dre. Mariana Morris, Wright State University, Dayton, OH, USA). L'OT synthétique (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA) a été marquée avec ¹²⁵I-Na en utilisant la lactoperoxidase. Le traceur iodé a été purifié par HPLC (*high performance liquid chromatography*) (LC-600, Shimadzu, Rochester, NY, USA) à l'aide d'une colonne C₁₈ Bondpack (uBondpack 4.6×250mm, WAT052860, San Jose, CA, USA). L'ocytocine iodée a

été éluée avec de l'acétonitrile 35% (CH_3CN) dans de l'acide trifluoroacétique (TFA) 0.1%. La courbe standard obtenue, transformée en échelle logarithmique, montre une linéarité entre les concentrations de 0.25-200 pg/mL. La réactivité croisée pour l'anticorps est de <1% avec l'arginine-vasopressine et la vasotocine. Le radioimmunos dosage a été réalisé dans du tampon sodium phosphate (50 mM NaPO_4 , pH 7.6 / 0.1% Bovine serum albumine / 0.01% sodium azide / 0.01% NaCl). Deux-cent microlitres de plasma ou de standard (0-200 pg/mL) ont été mélangés avec 200 μl d'anticorps (1:150 000) et 100 μl de ^{125}I -OT (3000 cpm) dans chaque tube et ont été incubés pendant 48h à 4°C. Le complexe anticorps-OT liée (froide ou chaude) a été séparée de la fraction libre par l'ajout de 1 mL d'une suspension de charbon-dextran puis centrifugé 25 min à 1500 \times g à température de 4°C. La radioactivité du surnageant a été mesurée au compteur gamma (E5005 Cobra II Auto Gamma, Perkin-Elmer Packard, Montreal, Canada) suivant un protocole préalablement établi. La concentration d'OT présente dans l'échantillon est inversement proportionnelle à la radioactivité mesurée. L'ordinateur du compteur gamma se rapporte aux données de la courbe standard pour calculer la concentration d'OT froide contenue dans les échantillons. Ces données sont alors multipliées par le facteur de dilution de l'échantillon afin d'obtenir la concentration finale d'OT dans l'échantillon. En ce qui concerne les échantillons d'urine, les concentrations de Na^+ et de K^+ ont été mesurées par photométrie de flamme au service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal.

Figure 13. Modèles pharmacocinétiques à un et à deux compartiments



Analyses pharmacocinétiques (PK). Lors de l'étude pilote en juillet 2004, les paramètres PKs de l'OT ont été décrits suite à une modélisation compartimentale effectuée par Dr. Jérôme del Castillo. Une modélisation compartimentale est en fait, une explication mathématique, et non physiologique, de l'ADME d'une substance par l'utilisation de compartiments. Par exemple dans les modèles les plus simples, tel qu'illustré ci-dessus, lorsqu'on administre une substance par la voie vasculaire, celle-ci s'homogénéise dans un volume V_1 , décrit par le compartiment central. Si la substance s'élimine à partir de ce compartiment selon un taux constant ou un processus d'ordre 1, le taux peut être représenté par la micro constante k_{10} . Dans le même ordre d'idée, suivant son administration intra vasculaire, la substance peut s'homogénéiser dans le compartiment central, V_1 , mais peut également se voir rapidement distribuée dans un volume V_2 , décrit par le compartiment périphérique, jusqu'à l'atteinte d'un état d'équilibre entre ces deux compartiments, tout dépend de la nature de la substance. Les taux de transferts entre ces deux compartiments sont alors décrits par les micro-constantes k_{12} et k_{21} , et sont évalués lors de l'atteinte de l'équilibre entre les deux systèmes.

La première analyse des courbes des variations des Cps d'OT en fonction du temps des données de l'étude pilote de juillet 2004 fut pratiquée avec le logiciel WinNonlin, version 1.5 (Pharsight corp., Mountain View, CA, USA). Dans le but de déterminer ou d'approximer les temps optimaux des prélèvements sanguins à réaliser lors de l'étude principale, une inspection graphique des dérivées partielles des micro-constantes de transfert k_{10} , k_{12} et k_{21} en fonction du temps a été réalisée à partir de cette analyse avec les données de l'étude pilote (Gabrielsson, J.L., 1997).

Pour les analyses PK, nous avons utilisé au moins 4 points sur la courbe des Cps mesurables d'OT en fonction du temps pour analyser le profil PK de chaque animal. Les données brutes de chaque animal ont été analysées individuellement en premier lieu à l'aide d'une analyse non compartimentale (Gibaldi & Perrier, 1982). Les estimés initiaux obtenus pour la clairance systémique (CL_T), le volume de distribution apparent (V_1) et le volume de distribution apparent à l'état d'équilibre (V_{ss}) ont été calculés comme suit :

$$CL_T = \text{Dose}/AUC \quad (1)$$

Où AUC est l'aire sous la courbe des Cps d'OT en fonction du temps.

$$V_I = \text{Dose}/C_0 \quad (2)$$

Où C_0 est la Cp initiale d'OT suivant une administration en bolus i.v., déterminée par extrapolation graphique au temps zéro.

$$V_{ss} = V_1 + V_2 \quad (3)$$

Où V_2 est l'estimé du volume de distribution.

Ces estimés ont été utilisés en tant que paramètres initiaux en vue de l'analyse compartimentale subséquente, décrit par un modèle mamillaire ouvert à deux compartiments où l'élimination s'effectue à partir du compartiment central (Gibaldi & Perrier, 1982) (en utilisant ADAPT II (D'Argenio & Schumitzky, 1997). Les micros-constantes de transfert (k_{12} et k_{21}) et celle du volume apparent du compartiment central V_C (k_{10}) ont été déterminées en utilisant l'estimation par ressemblance maximale (*maximum likelihood*) ou par les moindres carrés, de manière à obtenir l'ajustement le plus optimal. La clairance systémique (CL_T) a été calculée comme suit :

$$CL_T = V_C \cdot k_{10} \quad (4)$$

Où V_C est le volume du compartiment central et k_{10} est la micro-constante d'élimination à partir du compartiment central. La clairance de distribution (CL_D) a été calculée comme suit :

$$CL_D = V_C \cdot k_{12} \quad (5)$$

Où k_{12} est la micro-constante de transfert qui se fait à partir du compartiment central vers le compartiment périphérique. Le volume de distribution apparent du compartiment périphérique V_P a été calculé comme suit :

$$V_P = V_C \cdot k_{12} / k_{21} \quad (6)$$

Où k_{21} est la micro-constante de transfert qui se produit à partir du compartiment périphérique vers le compartiment central.

Analyses statistiques. L'homogénéité du poids des animaux parmi les différents groupes, les différences entre les estimés de CL_T , CL_D , V_C , V_{SS} , AUC et de demi-vie terminale ($t_{1/2}(\lambda_z)$) ont été évalués à l'aide d'une analyse utilisant un modèle linéaire sur les rangs, Kruskal Wallis, avec une erreur alpha à 0,05, puisque ce test non paramétrique est plus puissant dans les cas de petits échantillonnages (NCSS, Kaysville, UH, USA). Les données obtenues sur la diurèse, la natriurèse et la kaliurèse ont été analysées à l'aide du même logiciel, en utilisant un modèle linéaire suivi d'une analyse des contrastes deux à deux des estimés des moindres carrés.

CHAPITRE IV

4.0. RÉSULTATS

4.1. Résultats de l'étude pharmacocinétique de l'ocytocine – Publication soumise auprès de Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences

Revue officielle de la Société Canadienne des Sciences Pharmaceutiques dont le facteur d'impact se situe à 2,042.

4.2. Résultats de l'étude pharmacodynamique de l'ocytocine sur la fonction rénale – Sont présentés dans l'Annexe 1 (page xxiv).

NON-LINEAR PHARMACOKINETICS OF OXYTOCIN IN ANESTHETIZED RAT

Valérie Morin¹, Jérôme R.E. del Castillo¹, Simon Authier^{1,2}, Norma Ybarra¹, Colombe Otis¹, Dominique Gauvin¹, Jolanta Gutkowska³ and Éric Troncy¹

¹GREPAQ (Groupe de recherche en pharmacologie animale du Québec), Department of veterinary biomedicine, Faculty of veterinary medicine, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec.

²LAB Research Inc., Laval, Quebec.

³Laboratory of Cardiovascular Biochemistry, CHUM Research Center - Hôtel-Dieu, Montreal, Quebec.

Corresponding Author: Jérôme R.E. del Castillo, D.V.M., Ph.D., GREPAQ - Department of veterinary biomedicine, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Quebec, J2S 7C6, Canada.

[information retirée / information withdrawn]

ABSTRACT

Purpose: Because oxytocin (OT) is potentially useful in cardiovascular therapy but has hormonal roles on the cardiovascular and renal systems, we characterized its pharmacokinetic (PK) properties as a function of dose. **Methods:** A single intravenous bolus of OT was given at doses of 200, 300, 500, 1000, 3000, 5000 and 10000 ng·kg⁻¹ to anesthetized male rats (n ≥ 4 per dose). Blood samples (6) were taken over 72 min to 150 min, depending on dose. The individual time-courses of plasma OT concentrations were analyzed with a one- or an open two-compartment PK model. Kruskal Wallis tests (alpha=0.05) were used to compare the PK parameters among groups. **Results:** At doses up to 500 ng·kg⁻¹, OT showed a higher median systemic clearance ($CL_T = 0.0624 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$

$^1\cdot\text{kg}^{-1}$; 0.0622 ± 0.0228 as mean \pm SD value), a higher median central compartment volume of distribution ($V_C = 0.7906 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$; 0.6961 ± 0.1754) and a lower median elimination half life ($t_{1/2}(\lambda_z)$ 7.94 min; 9.08 ± 4.3) with respect to the higher doses ($CL_T = 0.0266 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$; 0.0284 ± 0.0098 , $V_C = 0.2213 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$; 0.2227 ± 0.1142 , and $t_{1/2}(\lambda_z)$ 21.09 min; 28.36 ± 21.8), all differences being significant ($p \leq 0.0008$). Minimal differences were found for the estimates of these PK parameters among the 4 higher OT doses. **Conclusion:** The PK properties and persistence of exogenous OT are not proportional to dose, therefore this must be accounted for in dosing regimen design for potential cardiovascular therapy.

INTRODUCTION

Oxytocin (OT) is widely used in gynecology and obstetrics to induce labor in women (1) and mare, to combat uterine inertia during parturition in all species, and to stimulate milk letdown in animals presenting agalactia (2). This hormone is present at equal concentrations in the plasma and neurohypophysis of both men and women (3-4). The absence of gender difference suggests other than the traditionally accepted roles for this nonapeptide. Recently, OT has demonstrated the capacity to differentiate embryonic murine stem cells into beating colonies of cardiomyocytes (5), to induce cardiogenic differentiation of adult stem cells (6-7), and to induce mitotic activity in the vascular endothelium (8) as well as cardiomyogenesis (9- 10).

Despite its widespread therapeutic use in human beings and animals, the pharmacokinetics (PK) of OT has been examined only in a limited number of studies (4,11-15). The time-course of its plasma concentrations in humans receiving a single i.v. bolus usually is described with an open two-compartment model. The PK data reported up to now for animals resembles that in humans. In goats receiving a single i.v. injection of OT ($2000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$), the plasma concentrations of this hormone also followed a

biexponential decay, with an initial (distribution phase) half-life of 1.94 ± 0.21 min, a terminal (elimination phase) half-life of 22.3 ± 0.3 min, and a total body clearance of 0.85 ± 0.02 L·h⁻¹·kg⁻¹. However, the apparent volume of distribution (V_{area}) of OT in goats is 0.46 ± 0.02 L·kg⁻¹ (12), a three times higher value than in men (15). A study on anesthetized rats receiving a constant infusion of 6040 ng·min⁻¹·kg⁻¹ reported a systemic clearance of 1.46 ± 0.22 L·h⁻¹·kg⁻¹ and an elimination half-life of 20.70 ± 1.55 min, as estimated from steady-state plasma concentrations (14).

From a pharmacodynamic perspective, important effects have been characterized on the cardiovascular and renal functions. Indeed, OT receptors are found in all chambers of the heart and in vascular endothelial cells (8,16), and OT participates in the regulation of cardiovascular functions and volume homeostasis by acting on cardiac receptors to modify cardiac rate and force of contraction (17-20). These results in isolated rat heart could not be reproduced exactly either in live rats (21) or in other species such as dog (22-24) and human beings (25). Historically, OT showed a natriuretic effect in rat (26-27) but, there is apparent discrepancy in the literature regarding the saluretic and diuretic properties of OT: some publications report a clear positive effect in rats (28-31), dogs (32-33), and human beings (34), but others report an absent or negative effect in rats (31,35-36), dogs (37-38) and humans (25). Such differences could be associated with the experimental design, in particular with choices regarding the dose, and administration route and method, as well as the degree of hydration/ volemia, gender or species. Our hypothesis states that the above mentioned pharmacodynamic cardiovascular and renal effects likely change the PK response of OT.

Considering the therapeutic potential of OT for cardiac regeneration, precise characterization of the PK profile for each species targeted as an evaluation model is required. PK characterisation is needed to optimize dosage regimen, as well as for recognition of species-specific pharmacodynamic effects. If the PK of OT is truly dose-

dependent, prediction of pharmacodynamic effects in a therapeutic dosage regimen is critical, especially in the context of cardiac failure treatment where adverse pharmacodynamic effects could affect clinical outcome. The objective of the study was to document the dose-linearity of the PK response to i.v.-administered OT bolus, by examining the relationship between dose and the area under the plasma concentration curve over time (*AUC*), as well as the stationarity of its compartmental PK parameters with respect to dose.

METHODS

Chemicals

Synthetic OT was purchased from Peninsula Laboratories (San Carlos, CA, USA). A sterile solution of OT in 0.9% NaCl saline was prepared and sterilized by filtration through a 0.45 μm polyethersulfone syringe filter (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA) before injection. The concentration of OT was adjusted in order to obtain a constant final dose volume of 1 mL. The inhibitors of plasma oxytocinase, pepstatin A and phenylmethanesulfonyl fluoride, were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (Oakville, ON, Canada). Specific antibodies against OT nonapeptide were a generous gift from Mariana Morris (Wright State University, Dayton, OH, USA). Chemicals for radioimmunoassay (RIA) analyses were at least of RIA grade. All other reagents and solvents were obtained from commercial source.

Animals

Experiments were performed according to guidelines from the Canadian Council on Animal Care with the approval of the institutional animal care and use committees before initiation of the study. Animal experiments were performed at LAB Research Inc. (Laval, QC, Canada), an AAALAC accredited facility. Adult Sprague-Dawley male rats (400-700

g) were obtained from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). To avoid any gender effect, we selected only males. Animals were housed in groups of 2 or 3 in a controlled environment (temperature $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$, humidity 30-70%, 12 hr light, 12 hr dark, 10-15 air changes per hr). Laboratory rat chow (Rodent Diet #2018C, Certified 18% crude protein, Teklad, Madison, WI, USA) and tap water were given *ad libitum*.

Animal Preparation

Animals were anesthetized with isoflurane/oxygen mixture with the vaporiser set at 2%. The animals were kept on heating pads (37°C). A butterfly needle (25 G) was placed in a tail vein for OT administration. Continuous infusion of Ringer's solution using a syringe pump (AS50, One Baxter Parkway, Deerfield, IL, USA) set at $10 \text{ mL}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ rate was provided to compensate for fluid loss during the experiment. The femoral vein was catheterized with an MRE-040 (Braintree Scientific Inc, Braintree, MA, USA) for blood sampling.

Experimental Procedures

Treatment was assigned randomly to 7 groups of rats ($n \geq 4$ each) according to a parallel design. In a first pilot study on isoflurane-anesthetized rats ($n = 8$), several doses of OT were tested for their intensity of cardiovascular effects. The highest OT dose without cardiovascular effect was $300 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$. Therefore, we selected doses of 200, 300, 500, 1000, 3000, 5000, 10000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ given as an i.v. bolus. A second pilot study ($n = 4$) was performed to estimate the baseline plasma OT concentration in rats dosed with a volume of saline equal to that to be used for the administration of OT, and to optimize the sampling timepoints (39) to be used in the main study. Blood samples (1 mL) were taken at the times listed in Table 1, and transferred to chilled EDTA vacuum tubes (Vacutainer, BD, Franklin Lakes, NJ, USA), fortified with 50 nmol pepstatin A, and 100 nmol phenylmethanesulfonyl fluoride. Upon blood collection, tubes were centrifuged for 10

minutes at $1500\times g$ and 4°C . Plasma was immediately harvested and stored at -70°C pending analysis.

Analytical Techniques

Plasma OT concentration was determined with a RIA technique developed in our laboratory, using specific antibodies against OT nonapeptide. Briefly, synthetic OT was labeled with ^{125}I -Na using the lactoperoxidase method (16). The iodinated tracer was purified by high performance liquid chromatography (LC-600, Shimadzu, Rochester, NY, USA) on a C_{18} Bondpack column (uBondpack $4.6\times 250\text{mm}$, WAT052860, San Jose, CA, USA). The iodinated OT was eluted with 35% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid. The RIA was performed in RIA buffer (50 mM NaPO_4 , pH 7.6; 0.1% Bovine serum albumine; 0.01% sodium azide; 0.01% sodium chloride). All the tubes containing 200 μL of sample or standard ($0\text{-}200\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were supplemented with 200 μL of antibody (1:150 000) solution, and 100 μL of ^{125}I -OT at a concentration providing 3 000 counts per minute. Following a 48h-long incubation at 4°C , the antibody-bound radioactivity was separated from free radioactivity by supplementing each tube with 1 mL of dextran-coated charcoal suspension and centrifuging for 25 min at $1500\times g$ at 4°C . The radioactivity in the supernatant was then measured with a gamma counter (E5005 Cobra II Auto Gamma, Perkin-Elmer Packard, Montreal, QC, Canada). Log-transformed data of the standard curve showed linearity within the range of 0.25-200 pg/mL and sensitivity of 0.1 pg/mL.

Pharmacokinetic analysis

Data from the 2nd pilot study was analysed with WinNonlin, version 1.5 (Pharsight corp., Mountain View, CA, USA) to find the optimal sampling times for the main study by graphic inspection of the partial derivatives of the transfer rate micro-constants k_{10} , k_{12} and k_{21} over time (39). The resulting timepoints allowed a minimum of 4 measurable OT

plasma concentrations per animal and tested dose. The mean baseline plasma OT concentration measured with the saline control rats was subtracted from the plasma OT concentrations obtained in the main experiment. Then, the individual sets of OT plasma concentrations were examined first with statistical moment PK analysis (40). The systemic clearance (CL_T), apparent volume of distribution (V_C) and steady-state volume of distribution (V_{ss}) were respectively estimated as:

$$CL_T = \text{Dose}/AUC \quad (1)$$

Where AUC is the area under the curve of plasma OT concentration as a function of time.

$$V_C = \text{Dose}/C_0 \quad (2)$$

Where C_0 is the initial plasma concentration of OT, as estimated from back-extrapolation of the time-concentration curve after the i.v. bolus dosing.

$$V_{ss} = CL_T/MRT = \text{Dose} \cdot AUMC/AUC^2 \quad (3)$$

Where MRT is the mean residence time of OT in the PK system (*i.e.*, the average time the administered OT molecules reside in the body before being eliminated), and $AUMC$ is the area under the momentum curve of the product of plasma OT concentration and time, as a function of time (*i.e.*, the first statistical moment).

These statistical moment estimates of PK parameters were used to derive the initial parameter values for a compartmental PK analysis with the ADAPT II software (40). To this end, a set of two ordinary differential equations corresponding to an open two-compartment mammillary model with drug output from the central compartment and first-order drug transfer rates was devised (41). These equations were parameterized with V_C and the transfer rate micro-constants k_{10} , k_{12} , and k_{21} (see below), and solved with

maximum likelihood estimation or generalized least square estimation. Goodness of fit to the data was assessed with the Akaike criterion and graphical examination of the residuals (39). After obtaining the best possible fit, systemic clearance (CL_T) was calculated as:

$$CL_T = V_C \cdot k_{10} \quad (4)$$

Where k_{10} is the elimination rate micro-constant from the central compartment.

Distribution clearance (CL_D) was:

$$CL_D = V_C \cdot k_{12} \quad (5)$$

Where k_{12} is the transfer rate micro-constant from the central compartment to the peripheral compartment. The apparent volume of the peripheral compartment V_P and V_{SS} were calculated as:

$$V_P = V_C \cdot k_{12} / k_{21} \quad (6)$$

$$V_{SS} = V_C + V_P = V_C \cdot (1 + k_{12} / k_{21}) \quad (7)$$

Where k_{21} is the peripheral-to-central compartment transfer rate micro-constant.

Statistical analysis

The homogeneity of animal weights across treatment groups and the differences between the estimates of CL_T , CL_D , V_C , V_{SS} , and terminal half life ($t_{1/2}(\lambda_2)$) were checked with a Kruskal-Wallis rank test analysis at a 0.05 alpha level, because this non-parametric test is deemed more powerful in cases a small sample (NCSS, Kaysville, UT, USA). In case of an overall significant difference in a given PK parameter, the Dunn's *post hoc* test was used to determine which dose groups were different from the others. The relationship between AUC and dose was examined with the use of a 3rd order polynomial linear

regression model (42), where the statistical significance of the intercept was used to detect departure from dose proportionality, and the statistical significance of the quadratic and cubic terms were used to detect departure from dose linearity (43).

RESULTS

No significant difference in body weight was found for the dose groups. The baseline plasma OT concentration in the saline control group was $22.92 \pm 10.89 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (mean \pm SD). Figure 1 shows the individual time-courses of plasma OT concentration in anesthetized rats dosed with a single 200 and 5000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v. bolus. The decay in plasma OT concentration was clearly monophasic (*i.e.*, a single slope) for the 200 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose, but was biphasic for the 5000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose. The time-concentration curves in rats dosed with 300 and 500 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT were similar to the 200 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ curves, therefore the open two-compartment PK model was reduced to an one-compartment model for the analysis of these 3 dose groups. In contrast, the decay in the time-concentration curves of the 1000, 3000 and 10000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose groups were biphasic as that of the 5000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose, which enables their analysis with the original two-compartment PK model. Two of the 8 rats in the 5000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose group behaved like the ones of the 10000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT group, which terminal slope (λ_z) was not as steep as those of all the other rats that received a dose of 1000, 3000 or 5000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ of OT. A bimodal tendency occurs from this dosage. The estimates of $t_{1/2}(\lambda_z)$ were significantly different accross treatment groups ($p \leq 0.0008$). The Dunn's *post-hoc* test allowed distinguishing the 200, 300 and 500 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT groups with significantly lower value of $t_{1/2}(\lambda_z)$ than the 1000, 3000 and 5000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT groups. It also revealed that this parameter was significantly higher than all other groups in rats dosed 10000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$.

The estimates of CL_T (Figure 2, upper panel) were significantly different among treatment groups ($p = 0.0008$). The *post hoc* test revealed that the lower dose groups

(from 200 to 500 ng·kg⁻¹ OT) had significantly higher CL_T estimates than the higher dose groups: 1000 ng·kg⁻¹ ($p = 0.002$), 5000 ng·kg⁻¹ ($p = 0.0003$) and 10000 ng·kg⁻¹ ($p = 0.03$). Marked variations in CL_D were also observed across the range of doses studied: those of the 200 to 500 ng·kg⁻¹ groups were immeasurable, but the estimates for the 1000 and 5000 ng·kg⁻¹ OT were significantly different ($p = 0.04$) (Figure 2, bottom panel). The estimates of V_C (Figure 3, upper panel) were significantly different across OT dose groups ($p < 0.0001$). This parameter was significantly higher in the rats dosed 200 to 500 ng·kg⁻¹ OT, as compared to the higher doses. Differences in V_{SS} were not significant for the doses of 200 to 500 ng·kg⁻¹ OT as compared to the 3000 and 10000 ng·kg⁻¹ ($p = 0.15$; Figure 3, bottom panel), but were significant between the 3 lower doses and the 1000 ng·kg⁻¹ ($p = 0.04$) and 5000 ng·kg⁻¹ ($p = 0.02$) OT groups. The estimates of AUC (Table 2) were significantly different among treatment groups ($p < 0.0001$) with AUC showing a negative quadratic correlation ($p = 0.03$) with dose's increase.

DISCUSSION

To our knowledge, the stationarity of OT PK parameters with respect to dose has never been examined when this hormone is given at pharmacologic doses. Because OT has potential usefulness in the regenerative therapy of post-ischemic myocardial disease, finding an appropriate dosing regimen for this new therapeutic use requires prior knowledge of its dose-concentration relationship. Most drug possess PK parameters that are independent of the administered dose and of the duration of the dosing regimen, which implies that systemic exposure to the drug increases linearly with the administered dose. In the case of OT, the cardiovascular and renal functions may be modified by the hormone to a point that its own plasma concentration is a covariate for its disposition PK parameters. Our study allowed confirmation of this hypothesis, as the distribution and clearance PK parameters of OT significantly depended on dose, and the time-course of

dose-normalized plasma OT concentration failed to satisfy the superposition principle (40).

All Studies studies reporting the PK of OT after an i.v. bolus all used an open two-compartment model to describe the time-course of its plasma concentration (12,14-15,44). Another study where rats were infused at a constant rate also reported a two-phase decay after the infusion was stopped (45). In our study, a one-compartment model best described the time-course of plasma OT concentration at doses of 200, 300 and 500 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, but that of the doses of 1000, 3000, 5000 and 10000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT was best described with the two-compartment model (Figure 1). The changes in the time-course of plasma OT concentration may be interpreted as hindrance of the PK processes of distribution and elimination as a consequence of the combined effects of OT on the cardiovascular and renal systems. Alternatively, it could be argued that numerical identification of the peripheral compartment was not possible at the lowest doses because of inadequate sampling schedule or bioanalytical limitations. But, our sampling covered the whole duration of plasma OT concentration above baseline values starting as early as 2 min after the bolus dosing, our RIA technique could quantify OT concentrations approximately 100 times below baseline values, the time-course of the dose-normalized plasma OT concentrations failed to satisfy the superposition principle, and the estimated $t_{1/2}(\lambda_2)$ of the lowest three OT doses significantly differed from the half-lives of the initial and terminal slopes of the four highest OT doses. Hence, it is unlikely that our PK analysis be biased by model misspecification. In consequence, the dose-related changes in compartmental PK parameters should provide insight to the cardiovascular and renal effects of OT in rats.

The compartmental PK analysis first revealed that the systemic clearance of OT significantly decreased when administered at doses of 1000, 5000 and 10000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, as depicted in Figure 2. Those results indicate that the elimination process of the drug is

faster (between 1.5 and 3 times) at doses under $500 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT and is considerably reduced at $1000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ and above, but tends to stabilize when that plasma level corresponding to the $1000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose is reached. In the case of a drug with linear kinetics, CL_T is the proportionality constant that relates plasma drug concentration to its rate of elimination. The OT is eliminated both by renal filtration (46) and metabolism by oxytocinase (47-48). Prior to hydrolysis by this enzyme (EC 3.4.11.3) OT molecule must bind to its receptor on the external surface of the endothelial cell membrane, which afterwards is internalized *via* the classic clathrin-mediated pathway (49) and eventually recycled onto the cell surface (46). In addition, OT binding sites have been found in the *macula densa* and thin Henle's loop of the rat kidney (50), which could mediate dual effects on renal filtration and reabsorption (see below). The dose-related decrease in CL_T suggest a saturation of the pool of OT receptors and/or oxytocinase molecules, with a plateau reached at the dose of $1000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT, or a decrease in renal excretion induced by OT at that dose. We will report in a separate communication the results of a study that examined the effects of OT on renal function. The results on CL_D are also suggestive of such saturation phenomenon with estimates being not measurable on 200 to $500 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT groups, while being quite homogenous between groups with higher doses: Only a marginal significant ($p = 0.04$) difference was noted between the 1000 and $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT groups for this parameter.

Second, it was noteworthy to find that the median V_C decreased abruptly at exogenous OT doses exceeding $500 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, and its inter-individual variability considerably increased (Figure 3). Similar changes were recorded for V_{SS} , although its median did not decrease with the OT dose as much as that of V_C . Because V_{SS} is the sum of the volumes of V_C and V_P , these combined findings imply a concurrent increase in V_P . This change in the structure of the PK system strongly suggests that V_P represents the population of receptors/enzymes where OT could bind on the vascular bed. The OT receptors of the external surface of the endothelium cell membrane are structurally

identical to the uterine and mammary OT receptors (8). These receptors, present in limited number, appear to have saturated at the plateau dose of 1000 ng·kg⁻¹ OT. At doses below 1000 ng·kg⁻¹ OT, as supported by our PK analysis, the pool of unoccupied OT receptors/enzymes would exceed the number of OT molecules available for binding, and the peripheral compartment may act predominantly as an elimination site. That is, the activity of oxytocinase in the peripheral compartment greatly exceeds the rate of transfer of OT back to the central compartment; therefore the body behaves as a kinetically homogeneous system that could be described with a one-compartment open model. At higher doses, the peripheral metabolic (oxytocinase) pathway saturates, which would restrict the availability of unoccupied OT receptors, hence forcing the peripheral compartment to behave more as a distribution site. Since OT binding to its receptor activates the translocation of oxytocinase and leads to peptide degradation, it would be interesting to quantify OT degradation metabolites. This measurement would represent a direct assessment of the apparent V_p . Unfortunately, no study evaluating OT metabolites is reported yet.

Third, as the OT dose increases and the oxytocinase pathway progressively saturated, it is likely that the rate of recycling of OT receptors decreased, which restricted the pool of unoccupied receptors sufficiently to delay the equilibrium between the two compartments (V_c and V_p) of the PK system. This delay in homogenization resulted in the development of a distribution phase in the time-course of plasma OT concentration, which slope is λ_1 and PK parameter is CL_D .

Fourth, our estimated CL_T and $t_{1/2}(\lambda_2)$ recorded for the doses of 1000 ng·kg⁻¹ OT or higher are compatible with those previously reported in the literature for human (4,11,15), goat (12) and rat (14), with CL_T around 1-1.5 L·h⁻¹·kg⁻¹ and $t_{1/2}(\lambda_2)$ around 20 min. Interestingly, the terminal slope λ_2 in the 10000 ng·kg⁻¹ OT group and in 2 individuals receiving 5000 ng·kg⁻¹ (Figure 1B and Table 2) were more than twofold

slower (42 min) than the other groups (Table 2). This could be associated, at least in part, with the onset of changes in the renal function following exposure to OT. Indeed, a study in conscious male rats found that 1000 ng i.v. injection of OT induced a +22% temporary (5 min duration) increase in mean systemic arterial blood pressure associated to a decrease in heart rate (-20%) and contractility (-15%) (51). Due to the short duration of cardiovascular effects, their implication on PK parameters dose-dependency is probably limited, if any. Moreover, saluretic and diuretic/antidiuretic effects of OT have been demonstrated in rats (29-31,36). If the natriuretic effect of OT is relatively constant between rat studies, it was hypothesized that low doses of OT induce diuresis *via* binding on OT receptor (or a non- V_{1a} non- V_2 vasopressin receptor) stimulating an increase in intracellular calcium (52), and high doses of OT induce antidiuresis *via* binding on V_2 vasopressin receptor stimulating a G_s protein, cyclic AMP release and aquaporine-2 opening (53,54). As stated above, these renal effects are highly variable, not only with the OT dose and way of administration, but also with the model: it was observed natriuresis and antidiuresis in dogs (38), and anti-natriuresis and antidiuresis in humans (25) following i.v. constant rate infusion of OT. Consequently, we could propose a dose-dependent interference of these pharmacodynamic effects on the PK of OT. Also, a tubuloglomerular reflex in response to increased natriuresis could lead to a reduction in the glomerular filtration rate. As a result, the elimination rate for this 1007 Dalton nonapeptide through the glomerular capillaries would be directly reduced and affect the PK elimination parameters. Our data suggests that the saturation of the endothelial receptors, of the oxytocinase activity added with a direct anti-diuretic effect and the possible negative retrocontrol of blood perfusion and kidney glomerular filtration rate for fluid homeostasis, explain the diminution of CL_T and the increased elimination half-life observed in animals receiving up to 1000 ng·kg⁻¹ OT.

CONCLUSION

This study showed the non-linearity of PK of OT in rats and proposes several hypotheses to explain this unique PK profile. A deeper understanding of the PK behaviour, particularly in relation with the metabolism of the peptide, is needed to confirm underlying mechanisms. Investigations of PK linearity in other species and studies of OT pharmacodynamics on volume homeostasis are also justified. The proof of non-linearity warrants important precautions in the therapeutic use of OT.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to LAB Research Inc. for supplying the animals, materials and installations, to Marianna Morris for supplying the OT antibody and the Canadian Institutes of Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Canada – New Emerging Team (#108291) program, for their precious financial support.

REFERENCES

- (1) Dudley, D.J., Oxytocin: use and abuse, science and art. *Clin Obstet Gynecol*, 40:516-524, 1997.
- (2) Al-Eknah, M.M. and Homeida, A.M., A review of some aspects of the pharmacology of oxytocin in domestic animals. *Veterinary Research Communications*, 15:45-55, 1991.
- (3) Ashton, N. and Balment, R.J., Sexual dimorphism in renal function and hormonal status of New Zealand genetically hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenhagen)*, 124(1):91-97, 1991.
- (4) Leake, R.D.; Weitzman, R.E. and Fisher, D.A., Pharmacokinetics of oxytocin in the human subject. *Obstetrics & Gynecology*, 56(6):701-704, 1980.
- (5) Paquin, J.; Danalache, B.A.; Jankowski, M.; McCann, S.M. and Gutkowska, J., Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(14):9550-9555, 2002.
- (6) Jankowski, M.; Danalache, B.A.; Wang, D.; Bhat, P.; Hajjar, F.; Marcinkiewicz, M.; Paquin, J.; McCann, S.M. and Gutkowska, J., Oxytocin in cardiac ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:13074-13079, 2004.
- (7) Matsuura, K.; Nagai, T.; Nishigaki, N.; Oyama, T.; Nishi, J.; Wada, H.; Sano, M.; Toko, H.; Akazawa, H.; Sato, T.; Nakaya, H.; Kasanuki, H. and Komuro, I., Adult

- cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 279:11384-11391, 2004.
- (8) Thibonnier, T.; Conarty, D.M.; Preston, J.A.; Plesnicher, C.L.; Dweik, R.A. and Erzurum, S.C., Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology*, 140(3):1301-1309, 1999.
 - (9) Jankowski, M.; Danalache, B.A. and Gutkowska, J., C-terminal oxytocin peptides induce cardiomyogenesis. [Abstract P112] *Hypertension*, 46(5):851, 2005.
 - (10) Danalache, B.A.; Paquin, J.; Donghao, W.; Grygorczyk, R.; Moore, J.C.; Mummery, C.L.; Gutkowska, J. and Jankowski, M., Nitric oxide signaling in oxytocin-mediated cardiomyogenesis. *Stem Cells*, 25(3):679-688, 2007.
 - (11) Seitchik, J.; Amico, J.; Robinson, A.G. and Castillo, M., Oxytocin augmentation in dysfunctional labor IV. Oxytocin pharmacokinetics. *Am J Obstet Gynecol*, 150(3):225-228, 1984.
 - (12) Homeida, A.M. and Cooke, R.G., Biological half-life of oxytocin in the goat. *Res Vet Sci*, 37:364-365, 1984.
 - (13) Thornton, S.; Davison, J.M. and Baylis, P.H., Effect of human pregnancy on metabolic clearance rate of oxytocin. *Am J Physiol*, 259:R21-R24, 1990.
 - (14) Lundin, S.; Broeders, A.; Ohlin, M.; Hansson, K.; Bengtsson, H.-I.; Trojnar, J. and Melin, P., Pharmacokinetic and pharmacologic properties of antiuterotonic oxytocin analogs in the rat. *J Pharmacol Exp Therap*, 264(2):783-788, 1993.
 - (15) De Groot, A.N.J.A.; Vree, T.B.; Hekster, Y.A.; Pesman, G.J.; Sweep, F.C.G.J.; Van Dongen, P.J.W. and Van Roosmalen, J., Bioavailability and pharmacokinetics of sublingual oxytocin in male volunteers. *J Pharm Pharmacol*, 47:571-575, 1995.
 - (16) Jankowski, M.; Hajjar, F.; Al Kawas, S.; Mukaddam-Daher, S.; Hoffman, G.; McCann, S.M. and Gutkowska, J., Rat heart: A site of oxytocin production and action. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:14558-14563, 1998.
 - (17) Favaretto, A.L.V.; Ballejo, G.O.; Albuquerque-Araújo, W.I.C.; Gutkowska, J.; Antunes-Rodrigues, J. and McCann, S.M., Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria *in vitro* that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides*, 18(9):1377-1381, 1997.
 - (18) Gutkowska, J.; Jankowski, M.; Lambert, C.; Mukaddam-Daher, S.; Zingg, H.H. and McCann, S.M., Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:11704-11709, 1997.
 - (19) Gutkowska, J.; Jankowski, M.; Mukaddam-Daher, S. and McCann, S.M., Oxytocin is a cardiovascular hormone. *Braz J Med Biol Res*, 33(6):625-633, 2000.
 - (20) Mukaddam-Daher, S.; Yin, Y.-L.; Roy, J.; Gutkowska, J. and Cardinal, R., Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin. *Hypertension*, 38:292-296, 2001.
 - (21) Petersson, M.; Alster, P.; Lundeberg, T. and Uvnäs-Moberg, K., Oxytocin causes a long-term decrease of blood pressure in female and male rats. *Physiology & Behavior*, 60(5):1311-1315, 1996.
 - (22) Nakano, J. and Fisher, D.R., Studies on the cardiovascular effects of synthetic oxytocin. *J Pharmacol Exp Ther*, 142:206-214, 1963.
 - (23) Armour, J.A.; Yuan, B.X. and Butler, C.K., Cardiac responses elicited by peptides administered to canine intrinsic cardiac neurons. *Peptides*, 11(4):753-761, 1990.

- (24) Neath, P.J.; Brown, D.C.; Hughes, D. and Perkowski, S.Z., The hemodynamic effects of intrathecal oxytocin in normal dogs. *Vet Anesthesia*, 29:272-277, 2000.
- (25) Rasmussen, M.S.; Simonsen, J.A.; Sandgaard, N.C.F.; Høilund-Carlsen, P.F. and Bie, P., Effects of oxytocin in normal man during low and high sodium diets. *Acta Physiol Scand*, 181:247-257, 2004.
- (26) Fraser, A.M., Actions of oxytocic hormone of pituitary gland on urine secretion. *J Physiol*, 101:238-251, 1942.
- (27) Sawyer, W.H., Posterior pituitary extracts and excretion of electrolytes by the rat. *Am J Physiol*, 16:583-87, 1952.
- (28) Chan, W.Y. and Du Vigneaud, V., Natriuretic, diuretic and anti-arginine-vasopressin (ADH) effects of two analogs of oxytocin : [4-leucine]-oxytocin and [2,4-diisoleucine]-oxytocin. *J Pharmacol Exp Ther*, 174(3):541-549, 1970.
- (29) Verbalis, J.G.; Mangione, M.P. and Stricker, E.M., Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology*, 128(3):1317-1322, 1991.
- (30) Conrad, K.P.; Gellai, M.; North, W.G. and Valtin, H., Influence of oxytocin on renal hemodynamics and sodium excretion. *Ann NY Acad Sci*, 689:346-362, 1993.
- (31) Sjöquist, M.; Huang, W.; Jacobsson, E.; Skøtt, O.; Stricker, E.M. and Sved, A.F., Sodium excretion and renin secretion after continuous versus pulsatile infusion of oxytocin in rats. *Endocrinology*, 140(6):2814-2818, 1999.
- (32) Brooks, F.P. and Pickford, M., The effect of posterior pituitary hormones on the excretion of electrolytes, in dogs. *J Physiol*, 142 :468-493, 1958.
- (33) Chan, W.Y. and Sawyer, W.H., Saluretic actions of neurohypophysial peptides in conscious dogs. *Am J Physiol*, 201 :799-803, 1961.
- (34) Kostoglou-Athanassiou, I.; Treacher, D.F. and Forsling, M.L., Is oxytocin natriuretic in man? *J Endocrinol*, 143(Suppl. O):39, 1994.
- (35) Conrad, K.P.; Gellai, M.; North, W.G. and Valtin, H., Influence of oxytocin on renal hemodynamics and electrolyte and water excretion. *Am J Physiol*, 251 :F290-F296, 1986.
- (36) Soares, T.J.; Coimbra, T.M.; Martins, A.R.; Pereira, A.G.F.; Carnio, E.C.; Branco, L.G.S.; Albuquerque-Araújo, W.I.C.; De Nucci, G.; Favaretto, A.L.V.; Gutkowska, J.; McCann, S.M. and Antunes-Rodrigues, J., Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:278-283, 1999.
- (37) Baird, S. and Pickford, M., The simultaneous occurrence of certain changes in uterine and renal activity in dogs, and the role of oxytocin in these phenomena. *J Physiol*, 144:80-91, 1958.
- (38) Andersen, S.E.; Engstrom, T. and Bie, P., Effects on renal sodium and potassium excretion of vasopressin and oxytocin in conscious dogs. *Acta Physiol Scand*, 145 :267-274, 1992.
- (39) Gabrielsson, J.L. and Weiner, D., Pharmacokinetic and Pharmacodynamic data analysis, Concepts and Applications, 2nd Edition. *Swedish Pharmaceutical Press*, Stockholm, Sweden, 1997.
- (40) D'Argenio, D.Z. and Schumitzky, A., ADAPT II user's guide pharmacokinetic/ pharmacodynamic systems analysis software. *Biomedical Simulations Resource*, Los Angeles, CA, U S A, 1997.

- (41) Gibaldi, M. and Perrier, D., Pharmacokinetics, 2nd Edition, Revised and Expanded. *Marcel Dekker, Inc*, New York, NY, U S A, 1982.
- (42) Neter, J., Applied linear statistical models: regression, analysis of variance and experimental designs, Neter, J.; Wasserman, W. and Kutner, M.H. – 3rd Edition. *Richard D. Irwin, Inc*, Homewood, IL, U S A, 1990.
- (43) Bonate, P.L., Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation. *Springer, Inc*, New York, NY, U S A, 2005.
- (44) Kowalski, W.B.; Diveky, L.; Mehendale, R.; Parsons, M. and Wilson, L. Jr., Effect of pregnancy on the metabolic clearance rate and the volume of distribution of oxytocin in the baboon. *Am J Physiol*, 274:E791-E795, 1998.
- (45) Fabian, M.; Forsling, M.L.; Jones, J.J. and Lee, J., The release, clearance and plasma protein binding of oxytocin in the anaesthetized rat. *J Endocrinol*, 43:175-189, 1969.
- (46) Gimpl, G. and Fahrenholtz, F., The oxytocin receptor system: Structure, function and regulation. *Physiology Reviews*, 81(2):629-683, 2001.
- (47) Nakamura, H.; Itakura, A.; Okamura, M.; Ito, M.; Iwase, A.; Nakanishi, Y.; Okada, M.; Nagasaka, T. and Mizutani, S., Oxytocin stimulates the translocation of oxytocinase of human endothelial cells *via* activation of oxytocin receptors. *Endocrinology*, 141(12):4481-4485, 2000.
- (48) Tsujimoto, M. and Hattori, A., The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751:9-18, 2005.
- (49) Guzzi, F.; Zanchetta, D.; Cassoni, P.; Guzzi, V.; Francolini, M.; Parenti, M. and Chini, B., Localization of the human oxytocin receptor in calveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response. *Oncogene*, 21:1658-1667, 2002.
- (50) Arpin-Bott, M.P.; Waltisperger, E.; Freund-Mercier, M.J. and Stoeckel, M.E., Two oxytocin binding subtypes in rat kidney: pharmacological characterization, ontogeny and localisation by *in vitro* and *in vivo* autoradiography. *J Endocrinol*, 153(1):49-59, 1997.
- (51) Costa-e-Sousa, R.H.; Pereira-Junior, P.P.; Oliveira, P.F.; Olivares, E.L.; Werneck-de-Castro, J.P.S.; Mello, D.B.; Nascimento, J.H.M. and Campos-de-Carvalho, A.C., Cardiac effects of oxytocin: Is there a role for this peptide in cardiovascular homeostasis? *Regulatory Peptides*, 132:107-112, 2005.
- (52) Han, J.S.; Macda, Y. and Knepper, M.A., Dual actions of vasopressin and oxytocin in regulation of water permeability in terminal collecting duct. *Am J Physiol*, 265:F26-F34, 1993.
- (53) Wargent, E.T.; Burgess, W.J.; Laycock, J.F. and Balment, R.J., Separate receptors mediate oxytocin and vasopressin stimulation of cAMP in rat inner medullary collecting duct cells. *Exp Physiol*, 84:17-25, 1999.
- (54) Joo, K.W.; Jeon, U.S.; Kim, G.-H.; Park, J.; Oh, Y.K.; Kim, Y.S.; Ahn, C.; Kim, S.; Kim, S.Y.; Lee, J.S. and Han, J.S., Antidiuretic action of oxytocin is associated with increased urinary excretion of aquaporin-2. *Nephrol Dial Transplant*, 19:2480-2486, 2004.

Table 1. Dosing groups, number of rats and timing of post-dosing blood samples used in the study.

Dose (ng·kg ⁻¹)	Number of rats	Post-dosing sampling number and time (min)					
		1	2	3	4	5	6
200	4	2	6	12	24	-	-
300	5	2	4	6	36	60	-
500	4	2	6	12	24		-
1000	4	2	4	6	36	60	-
3000	4	2	4	6	36	60	-
5000	8	4	12	30	90	120	150
10000	4	4	12	30	80	110	140

Table 2. Median estimates of selected compartmental pharmacokinetic parameters and variables of oxytocin after bolus intravenous administration in rats, as a function of dose.

Parameters (units)	Dose (ng·kg ⁻¹)						
	200	300	500	1000	3000	5000	10000
Number of compartments	1	1	1	2*	2	2	2
CL_T (L·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)	0.0825 ^a	0.0417 ^a	0.0624 ^a	0.0266 ^b	0.0370 ^a	0.0245 ^b	0.0333 ^b
CL_D (L·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)	N/D	N/D	N/D	0.03860 ^a	0.02561 ^a	0.00858 ^b	0.02077 ^a
V_C (L·kg ⁻¹)	0.8091 ^a	0.4878 ^a	0.8076 ^a	0.1346 ^b	0.0989 ^b	0.1384 ^b	0.2748 ^b
V_{SS} (L·kg ⁻¹)	0.8091 ^a	0.4878 ^a	0.8123 ^a	0.3459 ^b	0.4515 ^a	0.3455 ^b	0.9760 ^a
AUC (h·ng·L ⁻¹)	2219 ^a	8709 ^b	6742 ^b	36529 ^c	80087 ^d	200792 ^c	296439 ^c
$t_{1/2}(\lambda_z)$ (min)	6.92 ^a	9.38 ^a	9.27 ^a	18.22 ^b	20.14 ^b	17.63 ^b	42.01 ^c

Legend: ^{a, b, c} Results of dose groups with different superscripts statistically differ ($p < 0.05$); N/D not determined; * One subject was best fit with one-compartment PK model.

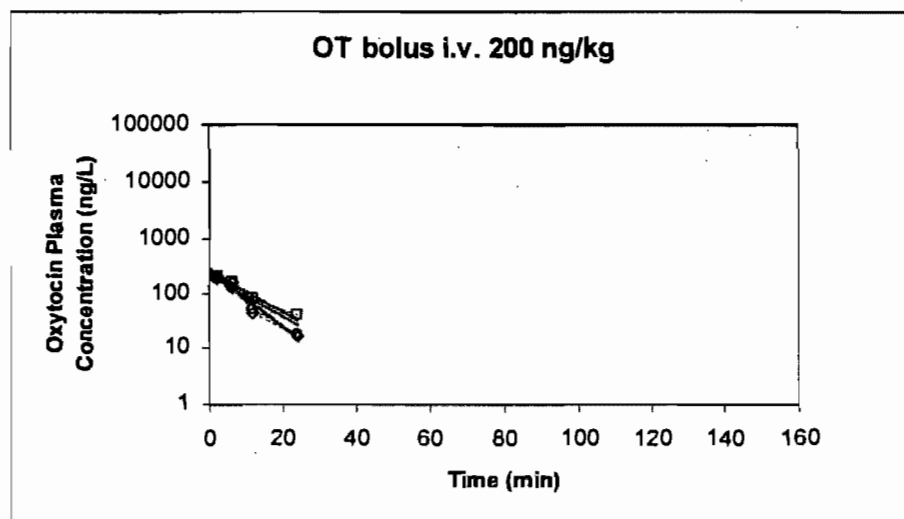


Fig. 1.A.

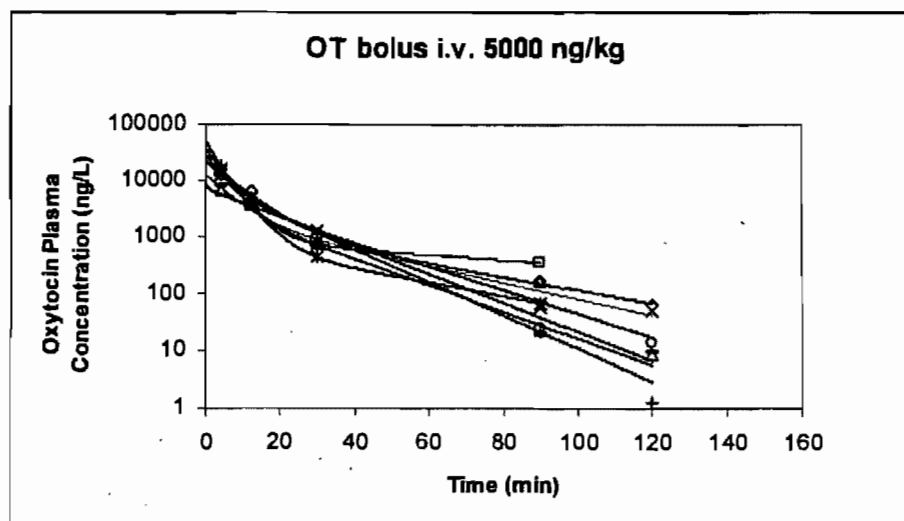


Fig. 1.B.

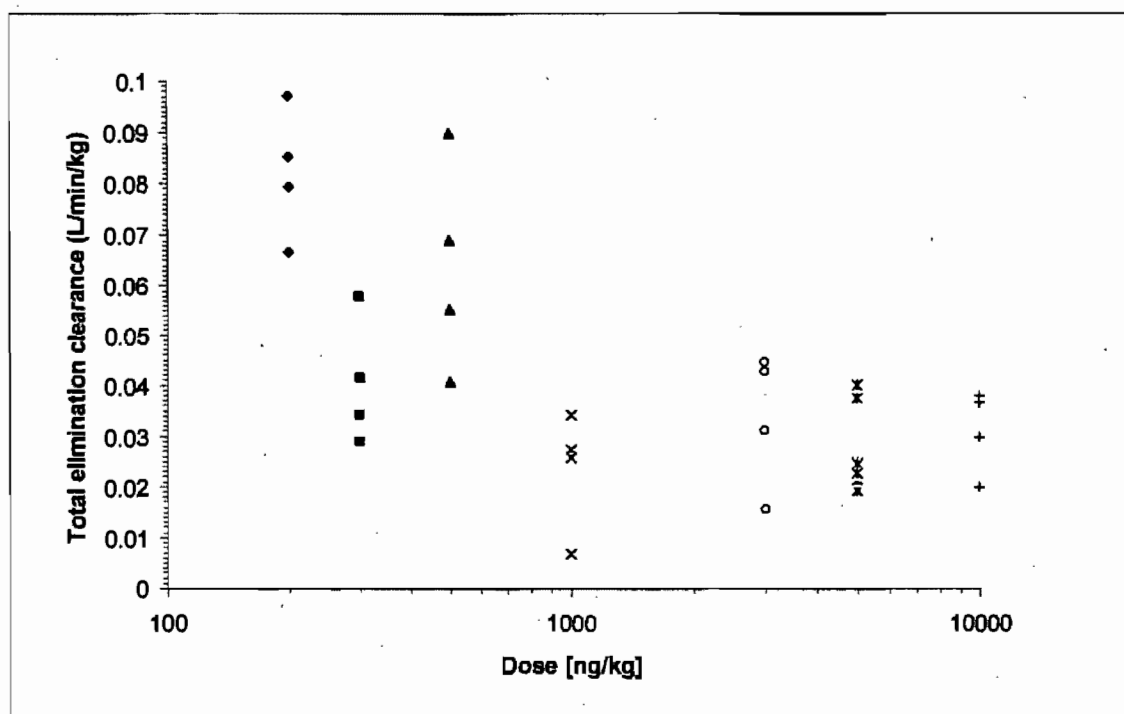


Fig. 2.A.

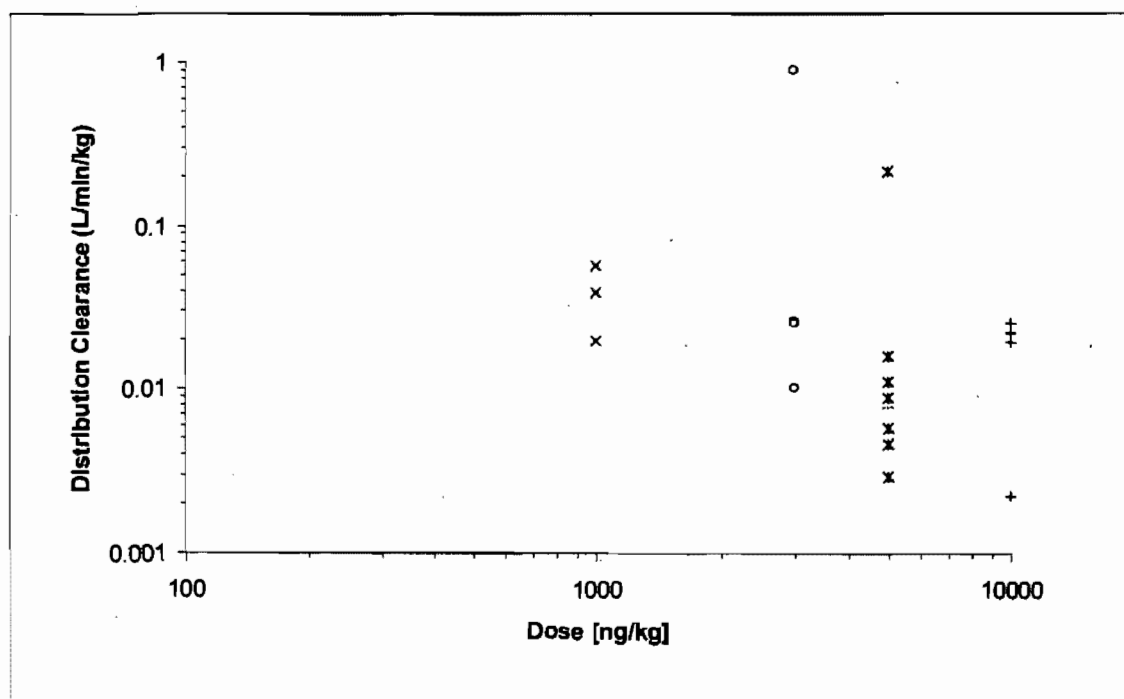


Fig. 2.B.

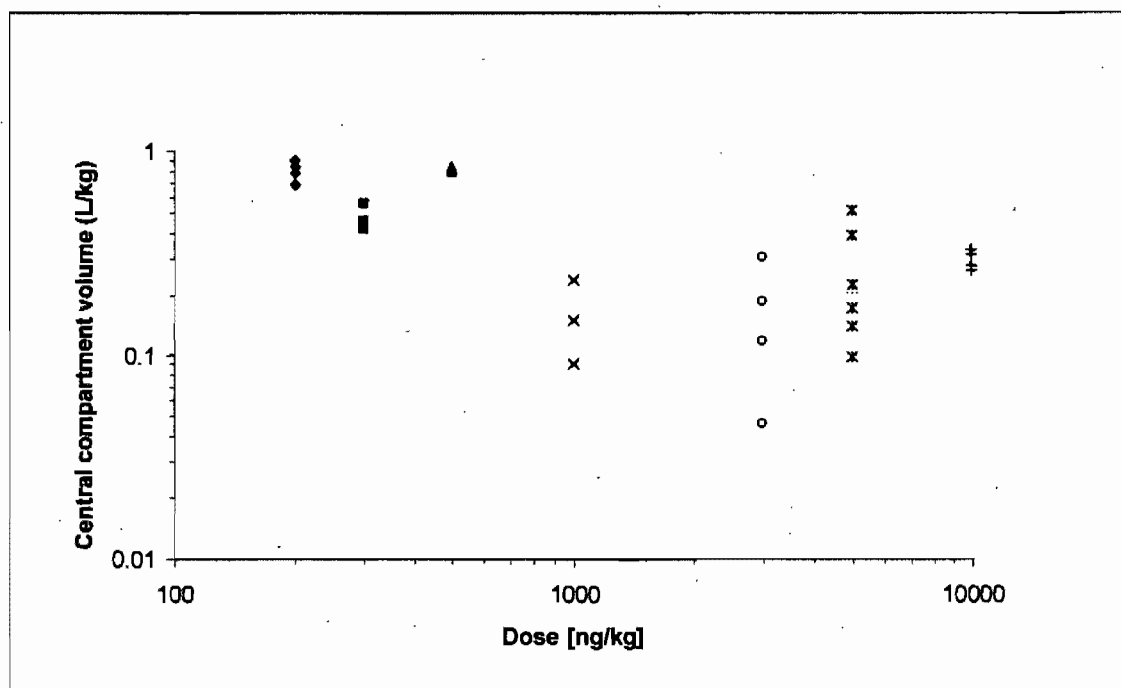


Fig. 3.A.

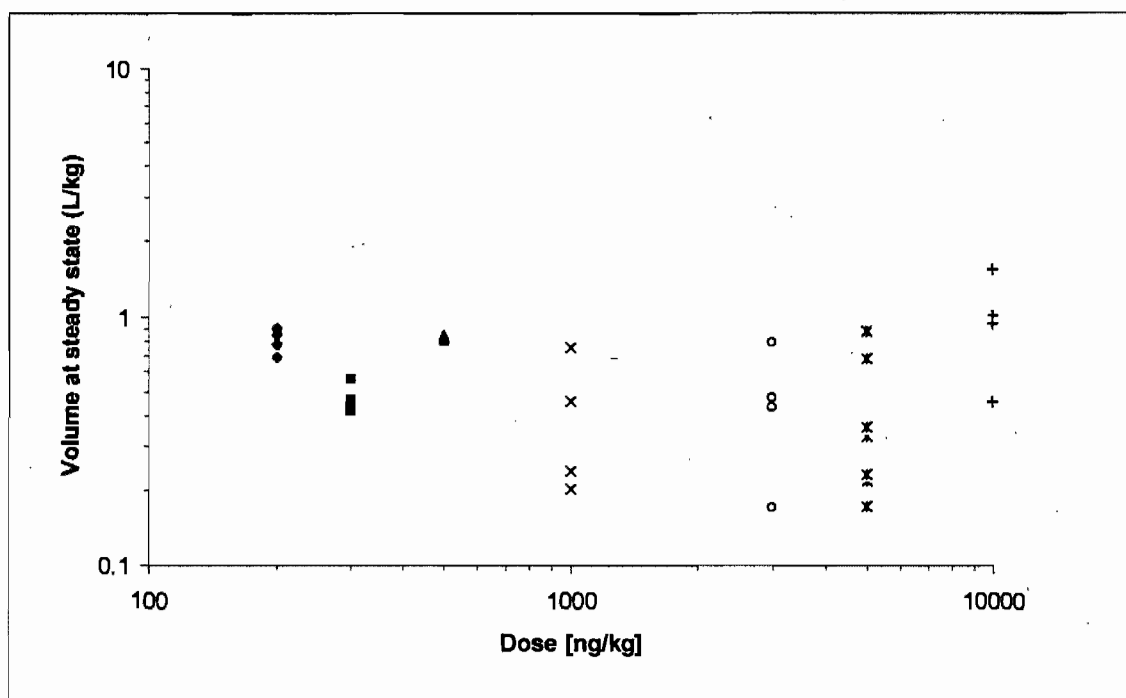


Fig. 3.B.

LEGENDS TO FIGURES:

Figure 1. Individual time-courses of dose-normalized, baseline-corrected oxytocin plasma concentrations in rats receiving a single i.v. bolus at a dose of 200 ng·kg⁻¹ (top), or 5000 ng·kg⁻¹ (bottom).

Figure 2. Elimination (A) and distribution (B) clearances of oxytocin in rats individually dosed with a single i.v. bolus, as a function of the administered dose.

Figure 3. Apparent volumes of the central compartment (A) and at steady state (B) for oxytocin in rats individually dosed with a single i.v. bolus, as a function of the administered dose.

CHAPITRE V

5.0. DISCUSSION GÉNÉRALE

À notre connaissance, la PK de l'OT en fonction de la dose n'a jamais été examinée lorsqu'administrée à des concentrations physiologiques. Puisque l'OT pourrait présenter une alternative intéressante en thérapie post-ischémique myocardique, cela requiert une connaissance approfondie de sa relation dose-concentration afin d'établir un dosage approprié. L'objectif ultime de ce travail était de documenter la PK de l'OT dans un éventail important de doses lorsqu'administrées en bolus intraveineux, afin de déterminer son statut dose-dépendant ou dose-indépendant. En effet, nous voulions vérifier l'hypothèse que l'OT devrait présenter une PK non linéaire, ou dose-dépendante puisque ses effets cardiovasculaires et rénaux pourraient affecter sa propre clairance. Ainsi, en observant la relation entre la dose absorbée et l'aire sous la courbe des Cps en fonction du temps pour diverses doses administrées et en examinant les constantes de vitesse de transfert et d'élimination pour chacune de ces doses, nous pourrions statuer sur la linéarité du modèle PK de l'OT (LeBlanc, P-P., 1997; Gibaldi & Perrier, 1982). Par ailleurs, en évaluant les effets PD sur la natriurèse, la diurèse et la kaliurèse, cela nous permettra d'expliquer en partie les causes de non-linéarité, si elle se manifeste, par la modification dans son excrétion rénale (en fonction de la dose) (LeBlanc, P-P., 1997; Gibaldi & Perrier, 1982), comme le suggère notre hypothèse. Ainsi, autant en gynécologie/obstétrique que dans une perspective d'utilisation thérapeutique, il s'avère une nécessité d'approfondir nos connaissances sur le comportement PK de l'OT car pour l'instant, nous ne pouvons nous appuyer que sur les données actuellement disponibles dans la littérature dont l'assurance est que chaque sujet est un essai biologique individuel (Association des pharmaciens du Canada, 1998).

5.1. Choix du modèle expérimental

Nous avons choisi d'utiliser le rat anesthésié dans cette étude afin de nous permettre de tester un large éventail de doses. Cet animal a l'avantage principal d'être peu coûteux *versus* un autre modèle de rongeur ou de non-rongeur. Également, nos installations permettaient d'instrumenter plusieurs animaux à la

fois, tel un travail en série (Figure 12), ce qui nous permettait de réaliser l'expérience sur 8 à 12 animaux en 1 journée. Cependant, le rat présente l'inconvénient majeur dans la limitation au niveau des prélèvements de sang pouvant être effectués sans altérer l'homéostasie. Par exemple, le prélèvement maximal de sang en un seul échantillon, qui assure la survie de l'animal, est d'approximativement 10 à 15% du volume sanguin ou 1,25 mL/100g poids corporel (Koch, M.A., 2006). Pour plusieurs petits prélèvements répétés sur 24 heures, 40% du volume sanguin peut être récolté sans qu'apparaisse de signes cliniques de détresse (le volume sanguin total du rat est ~ 65 mL/kg) (Koch, M.A., 2006) (voir paragraphe 5.3.1). Également, un autre inconvénient avec le rat est la difficulté à récolter l'urine par cystocentèse ou vidange vésicale. En effet, en raison de sa production d'urine qui est d'environ $5 \mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ de poids corporel (Baker, H.J., 2006), cela représente pour nous une limitation pour récolter et pour analyser l'urine (voir paragraphe 5.4). Cependant, pour notre projet et pour la suite des études qui seront effectuées sur d'autres espèces telles que le porc et le chien, l'utilisation du rat en première instance est utile pour déterminer le choix des doses à utiliser chez les autres espèces sus-mentionnées. Cependant, puisque nous avons réalisé nos expériences sur différents sujets sans réutilisation de ces derniers, sans quoi il aurait été nécessaire d'instrumenter les rats de manière permanente et cela comporte plus de complications que d'avantages, alors nous avons fait des comparaisons inter-individuelles, ce qui perd en puissance statistique et nécessite un effectif plus élevé afin de compenser.

Ensuite, il est difficile d'extrapoler les données du rat à l'humain en raison des variations inter-espèces. Cependant, le rat peut nous donner un bon indice du dosage par poids vif. En effet, connaissant les variations inter-espèces de l'OT sur ses effets rénaux (Rasmussen, M.S., 2004), il a été prévu d'effectuer d'autres études PK/PD de l'OT chez le porc, projet de ma collègue à la M.Sc., Dre. Norma Ybarra, et chez le chien et le singe, projets de mon collègue au Ph.D., Dr. Simon Authier. Ces études nous donneront un éventail plus complet de la PK de l'OT puisque la marge de manœuvre pour les prélèvements ne présente aucune limitation et nous serons en mesure de considérer les variations inter-espèces pour assurer une extrapolation plus juste pour l'humain. L'étude effectuée

préalablement chez le rat a tout de même eu l'avantage de nous permettre de situer les dosages intéressants à sélectionner pour la poursuite de la caractérisation PK de l'OT chez le porc, le chien et le singe.

Enfin, tous les animaux choisis pour l'étude étaient à l'âge adulte pour éviter des différences d'expression du système ocytocinergique et le choix du sexe masculin des animaux de cette étude a été fait pour éviter les interactions et modulations des effets causées par les hormones sexuelles femelles (Petersson, M., 1999).

5.2. Non-linéarité de l'ocytocine

Les PA qui présentent des PK linéaires possèdent des paramètres PK qui sont indépendants de la dose administrée et de la durée du régime d'administration, ainsi leur exposition systémique augmente de manière linéaire ou proportionnelle avec la dose administrée (LeBlanc, P-P., 1997; Gibaldi & Perrier, 1982). Dans le cas de l'OT, les fonctions cardiovasculaires et rénales peuvent être modifiées par les actions propres de l'hormone, ce qui entraîne que la concentration d'OT dans l'organisme est une covariable qui joue un rôle important dans la disposition de ses propres paramètres PK. Cela aboutit à des PK non-linéaires ou dose-dépendantes. Cette étude a permis de vérifier cette hypothèse; les paramètres PK de clairance et de distribution de l'OT (c'est-à-dire : CL_r , V_c , V_p , CL_D , $t_{1/2\beta}$) dépendent de la dose. De plus, les courbes des Cps en fonction du temps, normalisées par rapport à la dose, n'ont pas satisfait au principe de superposition des courbes, ce qui vient appuyer l'hypothèse de non-linéarité (Gibaldi & Perrier, 1982).

5.2.1. Modèle compartimental de l'ocytocine

Dans la littérature, trois études sur la PK ont toutes utilisé un modèle à deux compartiments pour décrire les courbes des Cps en fonction du temps et sont basées sur l'administration d'un bolus *i.v.* d'OT (De Groot, A.N.J.A., 1995; Homeida, A.M. & Cooke, R.G., 1984; Lundin, S., 1993; Kowalski, W.B., 1998). Une autre étude ayant utilisé des rats sous perfusion à débit constant d'OT a également décrit la courbe de Cp-temps avec deux composantes, ou modèle à deux compartiments, suivant l'arrêt de la perfusion (Fabian, M., 1969).

Cependant, dans notre étude, un modèle à un compartiment a le mieux décrit les paramètres PK pour les doses les plus faibles soit : 200, 300 et 500 ng·kg⁻¹ OT. En effet, suite à l'injection de l'OT dans le compartiment central, V_c , nous avons remarqué une seule pente, témoignant d'un procédé simple d'élimination à taux constant. Cependant, à plus haute dose soit : 1000, 3000, 5000 et 10000 ng·kg⁻¹ OT, un modèle à deux compartiments a le mieux décrit le profil des courbes Cp-temps observées. Ainsi, suite à l'administration d'OT dans le compartiment central, V_c , une phase rapide de distribution a été observée dans les premières minutes qui ont suivi son administration *i.v.*, puis une phase plus lente d'élimination à taux constant a suivi. Il est évident pour ces doses que la courbe de Cp-temps d'OT possède deux composantes; une phase de distribution puis une phase d'élimination (**Figure 1B de l'article**). Ainsi, puisque les doses les plus faibles ont montré un comportement PK correspondant à un modèle à un compartiment (avec une seule composante correspondant à l'élimination à taux constant de l'OT) tandis que les doses supérieures ou égales à 1000 ng·kg⁻¹ ont suivi un modèle à deux compartiments, cela présente déjà un indice de non-linéarité de l'OT.

5.2.2. Superposition des courbes des concentrations plasmatiques d'ocytocine en fonction du temps

Le principe de superposition des courbes des Cps d'un PA en fonction du temps, normalisées par rapport à la dose administrée, et comparées pour plusieurs doses, est attendu lorsqu'il y a linéarité dans le comportement PK du PA (Gibaldi & Perrier, 1982). En effet, lorsqu'un xénobiotique possède le même comportement PK peu importe la dose administrée, toutes les courbes Cp-temps (normalisées par rapport à une dose) sont superposables car elles possèdent les mêmes paramètres PK. De plus, les courbes de Cp-temps (non normalisées) sont proportionnelles avec l'augmentation de la dose, c'est-à-dire que si la dose administrée double, alors les Cps doublent également tout en demeurant proportionnelles (Gibaldi & Perrier, 1982). Cependant, en observant les **Figures 1A et 1B de l'article**, l'OT ne présente pas cette caractéristique car les courbes ne sont pas superposables et ne sont pas proportionnelles avec l'augmentation de la dose. Ce résultat suggère que l'OT ne suit pas une relation dose-indépendante. Ainsi, puisque la PK de l'OT

s'est révélée dépendante de la dose administrée, cela propose une possibilité que les effets physiologiques de l'OT sur certaines fonctions de l'organisme affectent son propre comportement PK. Alors, il faudrait regarder de plus près les phénomènes de distribution et d'élimination de l'OT, ainsi que ses effets pharmacodynamiques sur les fonctions physiologiques qui pourraient être impliquées, telles que les fonctions rénale et cardiovasculaire.

5.2.3. Clairance systémique de l'ocytocine

Dans le cas d'un médicament qui présente une PK linéaire, la clairance systémique ou totale (CL_T) est une constante de proportionnalité qui relie le taux d'élimination avec la C_p (voir Équation 4 dans Matériel et Méthodes). Cependant, dans le cas de l'OT nous observons que les estimés de CL_T (Figure 2A de l'article) sont significativement différents entre les groupes ($p = 0.0008$). Les contrastes ont été trouvés aux faibles doses d'OT, 200 à 500 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, qui ont montré des CL_T plus élevées comparativement aux plus hautes doses de 1000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p = 0.002$), 5000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p = 0.0003$) et 10000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p = 0.03$). En effet, une diminution d'environ 42% est observée à 1000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT où $CL_T = 0,0266$ L/min/kg comparativement à $CL_T = 0,0624$ L/min/kg pour la dose de 500 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$. Ce plus faible taux de CL_T est maintenu aux doses supérieures. Ces résultats indiquent que les procédés d'élimination de l'OT sont plus rapides et efficaces aux doses inférieures à 500 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ mais le sont considérablement moins aux doses supérieures à 1000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT, inclusivement. Les autres études rapportées chez le rat ont obtenu des valeurs de CL_T comparables à nos doses supérieures d'OT (1000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ et plus), ils ont obtenu une $CL_T = 0,024$ L/min/kg. Il est à noter qu'ils ont administré des perfusions à débit constant d'OT à des doses relativement élevées variant entre 150 et 200 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$, pendant 240 minutes (ou ~ 36000 ng/kg) (Lundin, S., 1993) ou 102 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$, pendant 30 minutes (ou ~ 3000 ng/kg) (Fabian, M., 1969), ce qui dépasse ou équivaut aux plus hautes doses testées dans la présente étude.

La CL_T de l'OT correspond à la sommation des processus d'élimination du peptide. Les processus d'élimination connus de l'OT se font *via* une clairance rénale, sous sa forme inchangée (Seitchik, J., 1984) ainsi que par une dégradation

par des aminopeptidases, dont l'enzyme ocytocinase (Lundin, S., 1993; Nakamura, H., 2000; Tsujimoto, M. & Hattori, A., 2004) et faiblement *via* une clairance hépatique, comme la plupart des hormones peptidiques (Chaudhury, R.R., 1959). Il a été évalué que les reins seraient responsables du tiers de la clairance totale de l'OT (Fabian, M., 1969). Par ailleurs, l'activation de l'enzyme ocytocinase participe de manière importante à la dégradation de l'OT : suite à la liaison de l'OT à son récepteur présent sur les cellules endothéliales, il y a translocation de l'ocytocinase *via* une voie dépendante de la protéine kinase C (Nakamura, H., 2000; Tsujimoto, M. & Hattori, A., 2004). Conséquemment, le récepteur OT est internalisé *via* une voie dépendante des clathrines (Guzzi, F., 2002) et pourra être récupéré à la surface cellulaire (Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001). Le résultat obtenu sur la CL_r supporte l'hypothèse d'une possible saturation de l'enzyme ocytocinase mais également, suggère une modification de la fonction rénale par l'OT. De ce point de vue, des sites de liaison de l'OT au niveau rénal ont été trouvés dans la *macula densa* ainsi que l'Anse de Henlé, chez le rat (Arpin, B.M., 1997), ce qui pourrait médier les effets sur la fonction rénale. Par ailleurs, il est bien documenté dans la littérature que l'OT produit des effets sur la natriurèse, la kaliurèse, la diurèse et le TFG (Fraser, A.M., 1942; Sawyer, W.H., 1953; Chan, W.Y., 1965; Peters, G. & Roch-Ramel, F., 1970; Chan, W.Y. & Du Vigneaud, V., 1970; Balment, R.J., 1980; Stier, C.T., 1980; Forsling, M.L., 1982; Garland, H.O., 1983; Conrad, K.P., 1986 & 1993; Verbalis, J.G., 1991; Brimble, M.J., 1991; Windle, R.J., 1995; Sjöquist, M., 1999). Ainsi, la CL_T de l'OT pourrait être affectée par ces effets rénaux, ce qui pourrait expliquer en partie la réduction de sa CL_r observée à dose supérieure ou égale à $1000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$. Cette hypothèse nécessite une évaluation des effets PD rénaux de l'OT en fonction de la dose. Nous avons donc ajouté une évaluation PD de la natriurèse, kaliurèse et diurèse en fonction des doses administrées correspondantes avec notre étude PK et avons obtenu des résultats vraiment intéressants (voir Annexe 1 et Discussion - section 5.4).

5.2.4. Volumes de distribution de l'ocytocine

Le volume de distribution du compartiment central, V_c , correspond à l'espace d'incorporation de l'OT dans l'organisme mais également à l'espace de mesure

des concentrations d'OT dans le système (Gibaldi & Perrier, 1982). Quant à lui, le volume de distribution apparent à l'état d'équilibre, V_{ss} , reflète le volume total des deux compartiments V_c et V_p (Gibaldi & Perrier, 1982).

Les estimés de V_c (**Figure 3A de l'article**) se sont révélés significativement différents entre les groupes ($p < 0.0001$). Ce paramètre est plus élevé parmi les groupes de rats ayant reçu les faibles doses d'OT, soit 200 à 500 ng·kg⁻¹ comparativement aux doses plus élevées, 1000 à 10000 ng·kg⁻¹. Ensuite, aucune différence statistiquement significative n'a été enregistrée pour le V_{ss} ($p = 0.15$) entre les faibles doses d'OT (200 à 500 ng·kg⁻¹) *versus* les hautes doses de 3000 ng·kg⁻¹ et 10000 ng·kg⁻¹ (**Figure 3B de l'article**). Cependant, nous avons observé des différences significatives concernant le V_{ss} pour les doses de 1000 ng·kg⁻¹ ($p = 0.04$) et de 5000 ng·kg⁻¹ ($p = 0.02$) lorsque comparées avec les doses les plus faibles. Nous expliquons cette signification, légère mais réelle, par une variation inter-individuelle des données obtenues aux plus faibles doses dûe à nos effectifs moins importants dans ces groupes, donc nous interprétons que le V_{ss} demeure relativement constant malgré tout. Il aurait été plus puissant, statistiquement parlant, d'avoir des effectifs égaux et plus nombreux dans chacun des groupes.

En résumé, nous observons que le V_c de l'OT diminue lorsque l'administration exogène d'OT dépasse 1000 ng·kg⁻¹ tandis que le V_{ss} demeure relativement constant pour toutes les doses (**Figures 3A et 3B de l'article**). Ainsi, puisque le V_{ss} demeure relativement constant, cela signifie indirectement que le V_p augmente puisque le V_c diminue, aux doses de 1000 ng·kg⁻¹ et plus d'OT. Cette augmentation dans le volume de distribution périphérique suggère fortement que V_p représente la population de récepteurs présents au niveau vasculaire. En effet, les récepteurs OT sont présents en quantité limitée au niveau vasculaire et ils semblent avoir été saturés à partir de ce dosage (1000 ng·kg⁻¹ d'OT). Pour appuyer cette hypothèse, des études antérieures ont montré et caractérisé la présence de ces récepteurs au niveau de l'endothélium vasculaire (Thibonnier, M., 1999; Jankowski, M., 2000). Par ailleurs, une étude de liaison des R-OT au niveau du ventricule gauche chez le rat ainsi qu'au niveau de l'atrium droit chez l'humain a révélé une plus grande affinité pour le tissu de rat ($K_d = 1$ nM, $B_{max} = 1480$

fmol/mg protéines) comparativement au tissu humain ($K_d = 75$ nM, $B_{max} = 3730$ fmol/mg protéines) (Cicutti, N.J., 1999). Puisque la liaison de l'OT à son récepteur active la translocation de l'enzyme ocytocinase entraînant le clivage du peptide, il serait intéressant de quantifier les métabolites de l'OT afin de définir son taux de dégradation enzymatique. Cette mesure représenterait une évaluation directe du volume apparent de distribution du compartiment périphérique V_p . Malheureusement, aucune étude n'a dosé à ce jour les métabolites de l'OT ni le taux de dégradation.

Ensuite, puisqu'aucun processus de distribution n'a été observé aux doses inférieures à 1000 ng·kg⁻¹ OT, tel que discuté au paragraphe 4.2.1 avec les compartiments, notre hypothèse est que le nombre de récepteurs OT excède le nombre de molécules d'OT, donc aucune saturation n'a été observée. Ainsi, à ces faibles doses de 200 à 500 ng·kg⁻¹, l'OT se fixerait rapidement aux récepteurs présents sans saturation du système R-OT / ocytocinase, qui se comporterait ainsi comme un système d'élimination. À partir de 1000 ng·kg⁻¹ et au-delà, la saturation du système R-OT / ocytocinase permet une distribution de l'OT et donc l'apparition d'un véritable compartiment périphérique.

5.2.5. Clairance de distribution de l'ocytocine

La clairance de distribution, CL_D , est représentative du taux de transfert entre le compartiment central et périphérique, V_c et V_p . Nous n'avons pas estimé la CL_D pour nos faibles doses, de 200 à 500 ng·kg⁻¹ OT, puisque ces groupes présentaient un modèle PK à un compartiment, exempt de phase de distribution. Nous avons cependant observé des différences significatives dans la CL_D entre les groupes ayant reçu les doses de 1000 ng·kg⁻¹ et de 5000 ng·kg⁻¹ OT ($p=0.04$) (**Figure 2B de l'article**). Ainsi, nous observons un déclin rapide dans l'homogénéisation (ou transfert d'équilibre) de l'OT entre les deux compartiments, V_c et V_p , à partir de la dose de 1000 ng·kg⁻¹ (**Figure 2B de l'article**), ce qui vient appuyer l'hypothèse de saturation des récepteurs présents au niveau vasculaire représentant l'espace V_p (voir paragraphe 5.2.4). Le fait d'avoir obtenu une CL_D significativement plus faible pour le groupe de 5000 ng·kg⁻¹ comparativement au groupe de 1000 ng·kg⁻¹, supporte l'hypothèse d'un possible changement dans la fonction rénale modulée

par l'OT à partir de la dose de 5000 ng·kg⁻¹ (voir paragraphe 5.4 sur les effets PD rénaux de l'OT pour explications plus approfondies), qui vient s'ajouter à l'hypothèse de la saturation des récepteurs OT vasculaires.

5.2.6. Demi-vie d'élimination de l'ocytocine

Les estimés de demi-vie d'élimination ($t_{1/2}(\lambda_z)$ ou $t_{1/2\beta}$) se sont révélés significativement différents entre les groupes de doses d'OT ($p \leq 0.0001$). Le test post-hoc Dunn a permis de distinguer des différences entre les groupes de rats ayant reçu les faibles doses d'OT soit, les groupes de 200 à 500 ng·kg⁻¹ OT comparativement aux groupes de 1000, 3000 et 5000 ng·kg⁻¹ OT. En effet, leurs valeurs de $t_{1/2}(\lambda_z)$ sont moins élevées pour les groupes des faibles doses de 200 à 500 ng·kg⁻¹ OT (Tableau 3 de l'article PK). Ce test a également révélé que les valeurs de $t_{1/2}(\lambda_z)$ sont significativement plus élevées pour le groupe de dose 10000 ng·kg⁻¹ OT comparativement à tous les autres groupes (Tableau 3 de l'article).

Nous avons obtenu des résultats similaires à une autre étude chez le rat pour les doses de 1000, 3000 et 5000 ng·kg⁻¹ OT soit, 18,6 minutes en moyenne pour ces trois groupes de notre étude comparativement à 20,7 min pour l'étude sous perfusion *i.v.* d'OT, à doses de 150 et 200 ng/kg/min, pendant 240 minutes (Lundin, S., 1993). Des résultats semblables ont également été trouvés chez l'homme, suite à l'administration *i.v.* de 1,71 µg d'OT (valeur obtenue de $t_{1/2\beta} = 19,8$ minutes) (De Groot, A., 1995). Cependant, l'analyse Dunn post-hoc des pentes d'élimination λ_z de l'OT des différents groupes de notre étude a constaté des différences importantes entre le groupe 10000 ng·kg⁻¹ OT ainsi que pour 2 individus du groupe de 5000 ng·kg⁻¹, comparativement aux autres groupes de doses (Figure 1B et Tableau 3 de l'article). La $t_{1/2\beta}$ de ces deux individus était similaire aux valeurs obtenues avec le groupe de la plus haute dose (10000 ng·kg⁻¹), en effet, ils ont obtenu une valeur de $t_{1/2\beta}$ deux fois plus lente (42 min) que les autres groupes de doses (Figure 1B). Cette valeur de $t_{1/2\beta}$ (42 min) n'a pas été retrouvée dans la littérature, mais aucune étude répertoriée n'a testé ces doses par bolus *i.v.*.

Ainsi, nous regardons l'hypothèse d'une possible diminution ou saturation dans les processus d'élimination de l'OT, causée par ses effets rénaux entre autre. En effet, l'OT est connue pour causer la natriurèse et la diurèse (Verbalis, J.G., 1991; Sjöquist, M., 1999; Soares, T.J., 1999) et des récepteurs de l'OT sont présents au niveau rénal (Arpin, B.M., 1997) mais à haute dose, l'OT peut se lier à des récepteurs de l'AVP causant l'anti-diurèse et la vasoconstriction rénale (voir paragraphe 2.8.8). En effet, il a été trouvé, sur rein de rat isolé, que de hautes concentrations d'OT induisaient une vasoconstriction rénale inhibée par un antagoniste du récepteur de l'AVP (sous-type V_{1a}), mais pas par un antagoniste du récepteur OT (Loichot, C., 2001). Ensuite, l'augmentation du $t_{1/2}(\lambda_z)$ lorsqu'on administre des doses plus élevées d'OT, soit $1000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ et plus, suggère une possible saturation des récepteurs endothéliaux, par conséquent de l'activité enzymatique de l'ocytocinase (Nakamura, H., 2000; Tsujimoto, M. & Hattori, A., 2004). Également, cela suggère une possible diminution du taux de filtration glomérulaire *via* un mécanisme non encore déterminé (réflexe tubulo-glomérulaire, vasoconstriction causée par la liaison à un autre récepteur apparenté tel V_{1a} , etc), qui explique par ailleurs en partie la diminution de la CL_r que nous avons observé ainsi que l'augmentation du temps de $t_{1/2}(\lambda_z)$ observé chez les 2 individus du groupe de $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ et ceux du groupe de $10000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT. En accord avec ces résultats, l'élimination de ce peptide de 1007 Da à travers les capillaires glomérulaires qui laissent passer les molécules inférieures à 7,5 nm, serait réduite. De plus, les données obtenues sur la diurèse, la natriurèse et la kaliurèse (voir paragraphe 5.4) appuient ces hypothèses en montrant une diminution marquée, ce qui est en accord avec la diminution de la CL_r en lien avec les effets de l'OT sur la fonction rénale. Des études plus approfondies des mécanismes de l'OT (et possiblement de ses métabolites) dans la filtration glomérulaire, la sécrétion et la réabsorption tubulaires, pourraient préciser ce phénomène.

5.2.7. Conclusion sur la non-linéarité de l'ocytocine

En somme, l'ajustement entre les modèles descriptifs et les points des courbes Cp-temps s'est avéré satisfaisant. Cela a permis de faire ressortir la non-linéarité de l'OT telle qu'illustrée par les variations significatives des paramètres PK en

fonction de la dose. Cette étude montre la non-linéarité du comportement PK de l'OT chez le rat mâle anesthésié. Cela signifie que les paramètres PK ne sont pas des constantes mais sont fonction de la C_p de l'OT à un certain temps. Les valeurs des paramètres PK sont normalement des caractéristiques intrinsèques pour un médicament, ou une constante pour chaque concentration administrée par la même voie (Gibaldi & Perrier, 1982).

À l'opposé, l'OT présente des différences dans ses paramètres de V_C , V_P , CL_D et CL_T aux faibles doses soit de 200, 300 et 500 ng·kg⁻¹ OT, comparativement aux autres doses plus élevées soit 1000, 3000, 5000 et 10000 ng·kg⁻¹ OT. Puisqu'il y a des changements dans les volumes et la clairance de distribution, cela suggère un cas de saturation des sites de liaison tissulaire. Puisqu'il y a des changements dans la clairance totale, cela suggère un cas de saturation dans la biotransformation et dans l'excrétion rénale (LeBlanc, P-P., 1997). D'autres études plus approfondies sur la corrélation entre la PK de l'OT avec ses métabolites et autres produits de dégradation subséquents à sa liaison avec son récepteur sont nécessaires.

5.3. Considérations à prendre dans la mise au point du protocole expérimental PK

Pour tenter d'établir efficacement une relation entre les doses administrées et les Cps mesurées en fonction du temps, il était nécessaire de réaliser d'abord une étude pilote. En effet, afin de déterminer les doses ainsi que les temps de prélèvements sanguins optimaux pour chaque dose, une étude pilote a été réalisée en juillet 2004 par l'équipe. L'analyse des résultats bruts et l'estimation des temps optimaux fut réalisée par Dr. Jérôme del Castillo. En bref, une inspection graphique des dérivées partielles des micro-constantes de transfert k_{10} , k_{12} et k_{21} en fonction du temps a été réalisée (Gabrielsson, J.L., 1997). La qualité de la courbe PK pour chaque dose (courbe des variations des Cps de l'OT en fonction du temps) repose en fait sur l'étalement optimal des points sur la courbe. En effet, notre difficulté principale était relative au nombre d'échantillons sanguins que nous pouvions prélever (voir paragraphe 5.3.1).

5.3.1. Limitation technique due au volume sanguin

Puisque le modèle animal utilisé est le rat, le volume de sang que l'on peut prélever sans affecter l'homéostasie de l'animal et mettre sa vie en danger s'avère être une limite importante pour l'expérience. En effet, environ 70% du poids corporel est constitué de fluide, en l'occurrence l'eau. Le volume sanguin total est estimé à 7% environ de la masse corporelle (Brown, R.P., 1997). Par exemple, le prélèvement maximal de sang en un seul échantillon, sans affecter la survie de l'animal, est d'approximativement 10 à 15% du volume sanguin ou 1,25 mL/100g poids corporel (Koch, M.A., 2006). Plusieurs petits prélèvements répétés sur 24 heures, représentant 40% du volume sanguin, peuvent être récoltés sans qu'apparaisse de signes cliniques de détresse (Koch, M.A., 2006). Cependant, lorsque des volumes importants sont prélevés, les concentrations des corticoïdes augmentent, le rythme cardiaque également et une mobilisation dans les fluides corporels est induite, ce qui pourrait affecter les paramètres étudiés (Koch, M.A., 2006). Le volume sanguin total du rat est estimé à ~ 64,1 mL/kg (Koch, M.A., 2006). Nous avons donc favorisé de prélever moins d'échantillons de sang, pour un maximum de 6 au total à raison de 1 mL par prélèvement, tout en répartissant au mieux les temps de prélèvements en moins de 2 heures, pour nous permettre d'observer les phases les plus importantes de la PK de l'OT ; la phase rapide de distribution et la phase plus lente d'élimination. Cela nous a permis de demeurer à la limite du 15% du volume sanguin total, en plus de répartir ces prélèvements dans le temps dans un espace étendu au lieu d'un seul prélèvement (voir **Tableau VIII**). Par ailleurs, nous avons administré à l'animal une fluidothérapie de support, pour compenser aux pertes de fluides, en accord avec les protocoles d'anesthésie et de chirurgie.

Ensuite, afin de prévenir et minimiser la coagulation dans les cathéters des veines fémorales, nous avons enduit les cathéters avec une solution de saline héparinée (100 UI/mL) avant leur insertion et nous avons rempli le volume mort du cathéter (environ 0,1 mL) avec de la saline physiologique après chaque prélèvement. Le volume de saline (environ 0,1 mL) a été retiré avant l'échantillonnage afin de ne pas diluer le sang, ce qui aurait faussé les mesures d'OT plasmatiques. Enfin, nous évaluons à environ 10% au total, le nombre de prélèvements où il y a eu des

problèmes dans la fonctionnalité des cathéters, ce qui est une valeur relativement faible démontrant que la technique fut convenable.

5.3.2. Choix des doses à tester

Le choix des doses d'OT doit prendre en considération la variabilité inter-individuelle associée à la relation dose-concentration car elles doivent être suffisamment espacées pour que la corrélation de linéarité s'y dégage, même avec des effectifs réduits. D'une part, les doses les plus faibles testées initialement, soit 300 et 1000 ng·kg⁻¹, furent sélectionnées en raison de l'absence d'effets cardiovasculaires observés lors d'une étude *in vivo* réalisée par l'équipe préalablement, dans un projet du Dr. Simon Authier. À partir de celles-ci, les autres doses de 3000, 5000 et 10000 ng·kg⁻¹ ont été sélectionnées pour tester notre hypothèse nulle de linéarité pharmacocinétique ou PK dose-indépendante. Les résultats obtenus avec ces doses se sont révélés concluants, observant une non-linéarité à partir de notre dose de 1000 ng·kg⁻¹, alors nous avons ajouté des doses intermédiaires de 200 et 500 ng·kg⁻¹ afin de vérifier la reproductibilité du comportement pharmacocinétique de l'ocytocine sous la dose de 1000 ng·kg⁻¹.

Il est à noter que le peptide OT se dissout instantanément dans la saline physiologique et que son administration *via* la veine caudale était relativement simple à effectuer et à observer. En effet, dans les cas où une administration périphérique se produisait, il était évident de le constater donc, nous avons noté ces événements mais n'avons pas utilisé ces individus dans notre analyse, heureusement cela est arrivé à une fréquence de < 1%.

5.3.3. Sélection des groupes

Le processus de sélection par hasard des individus parmi les groupes de doses a permis d'éviter l'introduction de biais potentiels à l'invalidation des résultats. Cependant, les effectifs inégaux entre certains groupes (n=10 *versus* n=4) rendent l'analyse statistique moins évidente, surtout causée par la petite taille des échantillons, ce qui peut contribuer à une perte de puissance. Il aurait été préférable d'uniformiser les effectifs dans chacun des groupes même si nous avons quand même obtenu des résultats statistiquement significatifs. Également,

les rats utilisés lors de cette étude avaient une masse corporelle variant entre 400 et 700 g, mais la distribution s'est révélée uniforme entre les groupes, ce qui minimise les biais engendrés par une distribution asymétrique. Les conditions de captivité et les conditions chirurgicales étaient normalisées, d'autant plus que ces étapes se sont déroulées à l'entreprise LAB Research inc., répondant aux standards normalisés de l'industrie et des agences réglementaires.

5.4. Effets pharmacodynamiques de l'ocytocine sur la natriurèse, la kaliurèse et la diurèse

Les données obtenues sur la PK de l'OT révèlent des changements dans la distribution (en hypothèse *via* la saturation des récepteurs OT vasculaires) et dans l'élimination de l'OT (en hypothèse *via* la saturation de la biotransformation par l'ocytocinase et *via* des changements dans la fonction rénale). Ainsi, pour vérifier notre hypothèse sur les changements occasionnés par l'OT sur la fonction rénale, la natriurèse, la diurèse et la kaliurèse ont été évaluées.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'administration d'OT par bolus *i.v.* tend vers une excrétion accrue de Na^+ et de K^+ ($p = 0,04$) et du volume d'urine ($p < 0,005$), atteignant une valeur maximale à la dose de $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT (Tableau IX et Figures 14 & 15). L'effet de l'OT sur la natriurèse, kaliurèse et diurèse tend à être relié avec la dose jusqu'à un dosage de $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT (Figures 14 & 15). En effet, l'absence d'effet d'OT sur la natriurèse, la kaliurèse et la diurèse, observées à partir de ce dosage (inclus), suggère une diminution dans la filtration glomérulaire concomitante avec la diminution de la CL_T et l'augmentation de la $t_{1/2\beta}$ obtenues dans l'étude PK (voir paragraphes 5.2.3 et 5.2.6). Il serait pertinent de déterminer le mécanisme par lequel cet effet se produit. Cependant, notre modèle animal ne nous a pas permis d'approfondir ce sujet vu ses limitations, mais des études sur le porc sont prévues pour répondre à cette question. De plus, nous avons observé un véritable effet dose seulement sur la kaliurèse (différence significative dans les groupes $300, 1000$ et $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT). La différence était significative pour la diurèse à 1000 et à $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT et pour la natriurèse seulement à $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT. On peut suspecter que notre mode de prélèvement d'urine comportait des limites (voir paragraphe 5.5), nous

empêchant d'observer adéquatement les effets de l'OT. Le débit urinaire a un effet sur l'élimination des PA. En effet, une augmentation du débit urinaire augmente l'excrétion rénale du PA et, par conséquent aussi, la clairance rénale (LeBlanc, P-P., 1997) ainsi, une diminution du débit urinaire a aussi l'effet de diminuer l'excrétion du PA. Par ailleurs, nous ne pouvons écarter à ce jour de la possibilité d'un réflexe tubulo-glomérulaire se produisant à haute dose d'OT, qui expliquerait cette diminution dans l'excrétion de Na^+ , de K^+ et de l'urine. Il est à noter que de hautes concentrations d'OT ont montré la capacité d'induire, sur le rein de rat isolé, une vasoconstriction rénale inhibée par un antagoniste du V_{1a} mais pas par un antagoniste du récepteur OT (Loichot, C., 2001) et on pourrait aussi suspecter à hautes un effet anti-diurétique de l'OT médiée par la stimulation des récepteurs AVP V_2 .

5.4.1. Évaluation du taux de filtration glomérulaire

Afin de répondre à la question de l'origine de la diminution dans l'excrétion de Na^+ , K^+ et de la diminution du volume d'urine produite, de la diminution de la CL_T et de l'augmentation de la $t_{1/2\beta}$, il serait opportun de mesurer le taux de filtration glomérulaire et évaluer le coefficient d'extraction de l'OT, à différentes doses. Un principe actif complètement extrait du sang par le rein, possède un coefficient d'extraction égal à l'unité (LeBlanc, P-P., 1997), donc l'évaluation de l'extraction de l'OT nous renseignerait sur les mécanismes impliqués dans son élimination. Des études chez le porc sont prévues à cet effet, projet de ma collègue à la M.Sc., Dre. Norma Ybarra. Il faut se rappeler que la filtration glomérulaire est un processus de diffusion passive et qu'elle n'est jamais saturée. Le paramètre qui décrit le mieux la capacité d'excrétion du rein est la clairance rénale. Un PA qui est filtré, non sécrété et non réabsorbé, a une clairance rénale égale au taux de filtration glomérulaire (LeBlanc, P-P., 1997), qui est aussi représenté par la clairance de la créatinine endogène. En utilisant l'inuline, un polysaccharide, comme marqueur de la clairance rénale, nous pourrions évaluer le taux de filtration glomérulaire puisque cette-dernière est une substance qui est filtrée et non réabsorbée ni sécrétée mais de plus, elle n'est pas un composé endogène donc ne présente pas de risques de fluctuer comme la créatinine peut le faire, d'autant plus que la créatinine peut être sécrétée par les cellules tubulaires

(Kuehnle, H.F., 1992). Par ailleurs, en utilisant l'acide para-aminohippurique (PAH), nous pourrions évaluer le débit rénal plasmatique puisque cet acide organique est entièrement sécrété par les cellules du tubule contourné proximal (Gabel, R.A., 1996). En effet, une molécule filtrée, complètement sécrétée (par transport actif) et non réabsorbée a une clairance rénale égale au débit sanguin rénal (LeBlanc, P-P., 1997). Ainsi, en administrant ces deux substances dans une étude avec un modèle animal qui permettrait une grande capacité de prélèvements de sang et d'urine tel que le porc, nous pourrions adéquatement évaluer les effets de différentes doses d'OT sur le taux de filtration glomérulaire et le débit rénal plasmatique, ce qui nous permettrait d'expliquer en partie les phénomènes observés chez le rat.

5.4.2. Conclusion sur les effets observés de l'ocytocine sur la natriurèse, la kaliurèse et la diurèse

Cette étude a tout de même permis d'observer une hausse dans l'excrétion de Na^+ , K^+ et d'urine causée par l'OT avec effet maximal à la dose de $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT. À partir de la dose de $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, l'absence d'effet sur la fonction rénale correspond avec la diminution de la CL_t et l'augmentation du $t_{1/2\beta}$ obtenues dans l'étude PK. Par ailleurs, en accord avec la littérature (Forsling, M.L., 1982; Forsling, M.L., 1994; Windle, R.J., 1995; Sjöquist, M, 1999), nous avons observé une hausse de la natriurèse, kaliurèse et diurèse causée par l'OT. Nos résultats indiquent que ces effets tendent à être reliés avec la dose administrée, atteignant un maximum à la dose de $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT. La rétro-action négative sur ces effets observée aux doses subséquentes peut s'expliquer par les effets rénaux propres aux doses élevées d'OT (réflexe tubulo-glomérulaire induisant une vasoconstriction de l'artère rénale afférente suite à une hausse de la concentration en Na^+ dans le filtrat urinaire, vasoconstriction rénale médiée par une stimulation de récepteurs à déterminer, possiblement AVP V_{1a} , effet anti-diurétique médié par une stimulation de récepteur AVP V_2 ou autres récepteurs distincts peut-être). D'autres études sont nécessaires, en utilisant un autre modèle animal, et/ou en augmentant la taille de l'échantillon, afin de tenter de comprendre et d'expliquer la diminution dans la filtration glomérulaire observée à $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ et plus d'OT administré par bolus *i.v.*.

5.5. Considérations à prendre dans la mise au point du protocole de la natriurèse, la kaliurèse et la diurèse

La cystocentèse s'est avérée techniquement une manœuvre de vidange vésicale difficile. En effet, le faible volume d'urine produit rendait la récolte difficile surtout aux faibles doses d'OT puisque le temps entre l'administration de la drogue et la récolte urinaire était plus court, 72 minutes, donc une moins grande production d'urine en résultait. Le taux normal d'urine produite par unité de temps est d'environ 5 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ de poids corporel (Baker, H.J., 2006). Aux plus hautes doses, le temps de prélèvement était plus long, jusqu'à 150 minutes mais également, l'OT pouvait induire plus de diurèse, ce qui rendait les prélèvements plus faciles à exécuter. En effet, les résultats obtenus quant à la diurèse ont été positifs. L'hormone produit cet effet diurétique, avec une tendance dose-proportionnelle, mais atteint un niveau significatif à 3000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($p=0.01$). Cependant, nous observons un événement particulier au-delà de ce dosage : la diurèse rejoint le niveau du groupe contrôle saline. Le manque d'effectifs et les difficultés d'échantillonnage rencontrées aux faibles doses d'OT représentent les limites majeures et explique que nous n'avons observé qu'une tendance pour la diurèse aux doses plus faibles que 3000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$. En effet, vue la faible quantité d'urine produite lors de l'échantillonnage, qui était réalisé au dernier temps de prélèvement du sang (voir **Tableau VIII**) ou à 15 minutes, alors l'effet diurétique a possiblement été dépassé car il a pu n'être que transitoire ou faible en intensité, ce qui nous a empêché d'atteindre une signification statistique. L'effet diurétique n'a possiblement été que transitoire, dans un intervalle de temps précis lorsque les Cps du peptide étaient suffisamment élevées pour cela. Nous n'avons possiblement pas réussi à observer le phénomène diurétique aux faibles doses car le modèle animal représente une limite car nous ne pouvons pas récolter de grands volumes en l'espace de 15 à 24 minutes, chez un rat.

5.6. Perspectives

Afin d'étudier davantage l'implication de l'OT dans la modulation des effets rénaux observés qui affectent son élimination, il serait pertinent de regarder de plus près les processus de filtration, de sécrétion et de réabsorption rénale de l'OT en fonction de la dose. Ainsi, en observant étroitement le taux de filtration

glomérulaire ainsi que le débit sanguin rénal, en fonction de la dose d'OT, nous pourrions évaluer l'origine des effets de l'OT dans la modulation des fonctions rénales et cela nous renseignerait sur les mécanismes impliqués dans son élimination. Sur ce même modèle, il sera également impératif d'établir les effets cardiovasculaires en fonction de la dose d'OT. Pour ces études, le recours à un modèle expérimental de grande taille, tel que le porc, ainsi que récemment entrepris par notre groupe, se justifie pleinement en raison des limites techniques que nous avons rencontrées sur notre modèle de rat.

Par ailleurs, il serait pertinent d'investiguer sur les métabolites de l'OT et autres produits de dégradation subséquents à sa liaison avec son récepteur afin d'élucider davantage sa distribution et répartition dans l'organisme ainsi que sur son élimination. Son modèle PK serait alors plus complet. Enfin, il serait intéressant d'effectuer une étude PK similaire, avec différentes doses mais en utilisant d'autres formes d'administration pour tester le maintien ou le non maintien de cette non-linéarité. Nous pourrions donc évaluer sa biodisponibilité et mieux documenter sa cinétique d'absorption. Toutefois ces dernières études ne se justifieront que si suite à la confirmation de PK non-linéaire chez le rat anesthésié, nos travaux subséquents établissent, hors de tout doute, un intérêt thérapeutique de l'OT lors d'infarctus du myocarde sur un modèle de rat. Par la suite, les données PK et PD devront être reproduites sur un modèle porcin, en raison de ses similitudes physiologiques et anatomiques dans le domaine cardiovasculaire avec l'Homme. Et alors, il sera temps de compléter éventuellement l'analyse PK de l'OT.

Au final, cette étude aura permis de constater que l'évolution des connaissances ouvre chaque jour une page supplémentaire sur l'interprétation des données et une utilisation plus adéquate des médicaments. Ainsi, les données sur l'OT pouvaient sembler acquises et son utilisation clinique à large échelle depuis des décennies en atteste en ce sens. Pourtant la dose-dépendance manifeste de sa PK telle que démontrée dans cette étude soulève des prudenances plus que nécessaires dans son utilisation future : en obstétrique animale ou humaine, bien évidemment, mais encore plus si l'on veut chercher à établir pleinement son potentiel de thérapeutique cardiorégénératrice, et il reste encore bien des questions à se poser.

CHAPITRE VI

6.0. CONCLUSION GÉNÉRALE

Les résultats de cette recherche sont fort intéressants, mais certains points demeurent à être précisés. En effet, cette étude a permis de caractériser le modèle PK de l'OT en fonction de la dose administrée, elle a révélé le caractère dose-dépendant ou non linéaire de la PK de l'OT. Les changements observés dans la clairance et la demi-vie d'élimination correspondent à un processus de saturation dans la biotransformation et dans l'excrétion rénale (LeBlanc, P-P., 1997). Les changements observés dans les volumes et clairances de distribution suggèrent un processus de saturation des sites de liaison tissulaire (LeBlanc, P-P., 1997). Afin d'éclaircir davantage la cause de la non-linéarité de l'OT, nous avons regardé les effets de l'OT sur la fonction rénale, laquelle est largement impliquée dans l'excrétion de ce peptide. Un fait intéressant est que les résultats obtenus sur la natriurèse, la kaliurèse et la diurèse montrent une augmentation avec la dose mais atteignent un maximum à la dose de $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ pour ensuite diminuer drastiquement à plus haute dose ($5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ et plus). Ainsi, un phénomène physiologique s'est produit pour avoir causé cette diminution de l'excrétion rénale pour lequel nous pouvons simplement proposer, sans l'avoir étudié précisément, un réflexe tubulo-glomérulaire impliquant l'OT ou une vasoconstriction rénale et/ou un effet anti-diurétique induits seulement aux hautes doses d'OT. De plus, cette diminution dans la natriurèse, la kaliurèse et la diurèse concorde avec la diminution de la CL_r et l'augmentation du $t_{1/2}(\lambda_2)$ obtenus dans l'étude PK.

CHAPITRE VII

7.0. SOURCES DOCUMENTAIRES

- 1- Al-Eknaah, M.M. & Homeida, A.M. A review of some aspects of the pharmacology of oxytocin in domestic animals. *Vet Res Commun.* 1991;15:45-55.
- 2- Ali, M.N. A comparison of some activities of arginine vasopressin and lysine vasopressin on kidney function in conscious dogs. *Br J Pharmacol Chemother.* 1958;13(2):131-137.
- 3- Altura, B.M., Altura, B.T. Actions of vasopressin, oxytocin and synthetic analogs on vascular smooth muscle. *Fed Proc.* 1984;43:80-86.
- 4- Amico, J.A., Tenicela, R., Johnston, J. & Robinson, A.G. Time-dependent peak of oxytocin exists in cerebrospinal fluid but not in plasma of humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;57:947-951.
- 5- Andersen, S.E., Engstrom, T., Bie, P. Effects on renal sodium and potassium excretion of vasopressin and oxytocin in conscious dogs. *Acta Physiol Scand.* 1992;145:267-274.
- 6- Ando, Y., Jacobson, H.R., Bryer, M.D. Phosphatidates inhibit vasopressin-induced water transport via protein kinase C activation. *Am J Physiol.* 1989;257(4 Pt 2):F524-F530.
- 7- Antunes-Rodrigues, J., De Castro, M., Elias, L.L.K., Valença, M., McCann, S.M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev.* 2004;84:169-208.
- 8- Argiolas, A. Oxytocin stimulation of penile erection. Pharmacology, site, and mechanism of action. *Ann NY Acad Sci.* 1992;652:194-203.
- 9- Arias, F. Pharmacology of oxytocin and prostaglandins. *Clin Obstet Gynecol.* 2000;43(3):455-468.

- 10- Arpin, B.M., Waltisperger, E., Freund, M.M., Stoeckel, M.E. Two oxytocin-binding site subtypes in rat kidney: pharmacological characterization, ontogeny and localization by in vitro and in vivo autoradiography. *J. Endocrinol.* 1997;153:49-59.
- 11- Ashton, N., Balment, R.J., Sexual dimorphism in renal function and hormonal status of New Zealand genetically hypertensive rats. *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*. 1991;124:91-97.
- 12- Association des pharmaciens du Canada. *CPS : Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques*. 33^{ème} édition, Leesa D. Bruce (ed.), Ottawa, Ontario, Canada, 1998.
- 13- Baird, S., Pickford, M. The simultaneous occurrence of certain changes in uterine and renal activity in dogs, and the role of oxytocin in these phenomena. *J Physiol.* 1958;144:80-91.
- 14- Baker, H.J. Selective Normative Data. In: *The laboratory rat*. Second Edition. Suckow, M.A., Weisbroth, S.H., Franklin, C.L (eds.), American College of Laboratory Animal Medicine Series, New York, New York, U.S.A., 2006.
- 15- Balment, R.J., Brimble, M.J. & Forsling, M.L. Release of oxytocin induced by salt loading and its influence on renal excretion in the male rat. *J Physiol.* 1980;308:439-449.
- 16- Balment, R.J., Brimble, M.J., Forsling, M.L., Kelly, L.P., Musabayane, C.T. A synergistic effect of oxytocin and vasopressin on sodium excretion in the neurohypophysectomized rat. *J Physiol.* 1986;381:453-464.
- 17- Barberis, C., Mouillac, B., Durroux, T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol.* 1998;156:223-229.
- 18- Bicknell, R.J. Endogenous opioid peptides and hypothalamic neuroendocrine hormones. *J Endocrinol.* 1985;107:437-446.

- 19- Birnbaumer, M., Seibold, A., Gilbert, S., Ishido, M., Barberis, C., Antaramian, A., Brabet, P., Rosenthal, W. Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature*. 1992;357:333-335.
- 20- Bockaert, J., Pin, J.P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*. 1999;18:1723-1729.
- 21- Bourque, C.W., Oliet, S.H.R., Richard, D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol*. 1994;15(3):231-274.
- 22- Brimble, M.J. & Dyball, R.E.J. Characterization of the responses of oxytocin- and vasopressin-secreting neurons in the supraoptic nucleus to osmotic stimulation. *J Physiol*. 1977;271:253-271.
- 23- Brimble, M.J., Balment, R.J., Smith, C.P., Windle, R.J., Forsling, M.L. Influence of oxytocin on sodium excretion in the anaesthetized Brattleboro rat. *J Endocrinol*. 1991;129(1):49-54.
- 24- Brimble, M.J., Dyball, R.E.J., Forsling, M.L. Oxytocin release following osmotic activation of oxytocin neurones in the paraventricular and supraoptic nuclei. *J Physiol*. 1978;278:69-78.
- 25- Brooks, F.P., Pickford, M. The effect of posterior pituitary hormones on the excretion of electrolytes, in dogs. *J Physiol*. 1958;142:468-493.
- 26- Brotanek, V., Kazda, S. Differences in the vasodepressor reaction to oxytocin in men and nonpregnant and pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 1965;93:547-552.
- 27- Brown, R.P., Delp, M.D., Lindstedt, S.L., Rhomberg, L.R., Beliles, R.P. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Tox & Ind Health*. 1997;13(4):407-484.
- 28- Brownstein, M.J., Russell, J.T., Gainer, H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science*. 1980;207:373-378.
- 29- Buijs, R.M. Vasopressin and oxytocin: Their role in neurotransmission. *Pharmacol Therapeut*. 1983;22:127-141

- 30-Carmichael, M.S., Humbert, R., Dixen, J., Palmisano, G., Greenleaf, W., Davidson, J.M. Plasma oxytocin increases in the human sexual response. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64:27-31.
- 31-Chan, W.Y. Effects of neurohypophysial hormones and their deamino analogues on renal excretion of Na, K and water in rats. *Endocrinol.* 1965;77(6):1097-1104.
- 32-Chan, W.Y., Du Vigneaud, V. Natriuretic, diuretic and anti-arginine-vasopressin (ADH) effects of two analogs of oxytocin: [4-leucine]-oxytocin and [2,4-diisoleucine]-oxytocin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1970;174(3):541-549.
- 33-Chan, W.Y., Sawyer, W.H. Saluretic actions of neurohypophysial peptides in conscious dogs. *Am J Physiol.* 1961;201:799-803.
- 34-Charbit, B., Funck-Brentano, C., Samain, E., Jannier-Guillou, V., Albaladejo, P., Marty, J. QT interval prolongation after oxytocin bolus during surgical induced abortion. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76:359-364.
- 35-Chaudhury, R.R., Walker, J.M. The fate of injected oxytocin in the rabbit. *J Endocrinol.* 1959;19:189.
- 36-Chen, Y.C., Cadnapaphornchai, M.A., Schrier, R.W. Clinical update on renal aquaporins. *Biol Cell.* 2005;97:357-371.
- 37-Chen, Y.L., Shepherd, C., Spinelli, W., Lai, F.M. Oxytocin and vasopressin constrict rat isolated resistance arteries by activating vasopressin V1A receptors. *Eur J Pharmacol.* 1999;376:45-51.
- 38-Chini, B., Mouillac, B., Balestre, M.N., Trumpp, K.S., Hoflack, J., Hibert, M., Andriolo, M., Pupier, S., Jard, S., Barberis, C. Two aromatic residues regulate the response of the human oxytocin receptor to the partial agonist arginine vasopressin. *FEBS Lett.* 1996;397:201-206.

- 39-Chriguer, R.S., Rocha, M.J., Antunes-Rodrigues, J., Franci, C.R. Hypothalamic ANP and secretion of oxytocin. *Brain Res.* 2001;889(1-2):239-242.
- 40-Cicutti, N.J., Smyth, C.E. Oxytocin receptor binding in rat and human heart. *Can J Cardiol.* 1999;15(11):1267-1273.
- 41-Conrad, K.P., Gellai, M, North, W.G., Valtin, H. Influence of oxytocin on renal hemodynamics and electrolyte and water excretion. *Am J Physiol.* 1986;251:F290-F296.
- 42-Conrad, K.P., Gellai, M., North, W.G., Valtin, H. Influence of oxytocin on renal hemodynamics and sodium excretion. *Ann NY Acad Sci.* 1993; 689:346-362.
- 43-Costa-e-Sousa, R.H., Pereira-Junior, P.P., Oliveira, P.F., Olivares, E.L., Werneck-de-Castro, J.P.S., Mello, D.B., Nascimento, J.H.M., Campos-de-Carvalho, A.C. Cardiac effects of oxytocin: Is there a role for this peptide in cardiovascular homeostasis? *Regul Pept.* 2005;132:107-112.
- 44-Coulson, C.C., Thorp, J.M. Jr., Mayer, D.C., Cefalo, R.C. Central hemodynamic effects of oxytocin and interaction with magnesium and pregnancy in the isolated perfused rat heart. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177(1):91-93.
- 45-Crall, H.D., Mattison, D.R. Oxytocin pharmacodynamics : effect of long infusions on uterine activity. *Gynecol Obstet Invest.* 1991;31:17-22.
- 46-Cummiskey, K.C., Gall, S.A., Dawood, M.Y. Pulsatile administration of oxytocin for induction of labor. *Obstet Gynecol.* 1989;74:869-872
- 47-D'Argenio, D.Z., Schumitzky, A. ADAPT II user's guide pharmacokinetic /pharmacodynamic systems analysis software. In: *Biomedical Simulations Resource*, Los Angeles, CA, USA, 1997.
- 48-Dale, H.H. On some physiological actions of ergot. *J Physiol.* 1906;34:163-206.

- 49-De Groot, A.N.J.A., Vree, T.B., Hekster, Y.A., Pesman, G.J., Sweep, F.C.G.J., Van Dongen, P.J.W., Van Roosmalen, J. Bioavailability and pharmacokinetics of sublingual oxytocin in male volunteers. *J Pharm. Pharmacol.* 1995;47:571-575.
- 50-Du Vigneaud, V., Ressler, C., Trippett, S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem.* 1953;205:949-957.
- 51-Edwards, B.R., LaRochelle F.T. Antidiuretic effect of endogenous oxytocin in dehydrated Brattleboro homozygous rats. *Am J Physiol.* 1984;247(3 Pt 2):F453-F465.
- 52-Fabian, M., Forsling, M.L., Jones, J.J., Lee, J. The release, clearance and plasma protein binding of oxytocin in the anesthetized rat. *J Endocrinol.* 1969;43:175-189.
- 53-Favaretto, A.L.V., Ballejo, G.O., Albuquerque-Araujo, W.I.C., Gutkowska, J., Antunes-Rodrigues, J., McCann, S.M. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptide.* 1997;18(9):1377-1381.
- 54-Fenelon, V.S., Poulain, D.A., Theodosis, D.T. Oxytocin neuron activation and fos expression: A quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience.* 1993;53(1):77-89.
- 55-Fernando, A. Pharmacology of oxytocin and prostaglandins. *Clin Obstet Gynecol.* 2000;43(3):455-468.
- 56-Fitzpatrick, R.J. The estimation of small amounts of oxytocin in blood. In: Caldeyro-Bracia, R., Heller, H (eds.), *Oxytocin*, Pergamon Press, Oxford, London, Great Britain, 1961.
- 57-Flint, A.P., Leat, W.M., Sheldrick, E.L., Stewart, H.J. Stimulation of phosphoinositide hydrolysis by oxytocin and the mechanism by which

- oxytocin controls prostaglandin synthesis in the ovine endometrium. *Biochem J.* 1986;237:797-805.
- 58- Forsling, M.L., Brimble, M.J., Balment, R.J. The influence of vasopressin on oxytocin-induced changes in urine flow in the male rat. *Acta Endocrinol.* 1982;100:216-220.
- 59- Forsling, M.L., Judah, J.M., Windle, R.J. The effect of vasopressin and oxytocin on glomerular filtration rate in the conscious rat : contribution to the natriuretic response. *J Endocrinol.* 1994;141:59-67.
- 60- Fraser, A.M. Actions of oxytocic hormone of pituitary gland on urine secretion. *J Physiol.* 1942;101:238-251.
- 61- Frayne, J., Nicholson, H.D. Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts :evidence for a physiological role of oxytocin in the male. *Mol Hum Reprod.* 1998;4:527-532.
- 62- Fuchs, A.R., Fuchs, F. Endocrinology of human parturition : a review. *Br. J Obstet Gynecol.* 1984;91:948-967.
- 63- Fuchs, A.R., Romero, R., Keefe, D., Parra, M., Oyarzun, E., Behnke, E. Oxytocin secretion and human parturition: pulse frequency and duration increase during spontaneous labor in women. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165:1515-1523.
- 64- Gabel, R.A. Ranaei, R.A. Kivlighn, S.D. A new method of measuring renal function in conscious rats without the use of radioisotopes. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1996;36(4):189-97.
- 65- Gabrielsson, J.L., Weiner, D.; *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic data analysis, Concepts and Applications.* 2e éds., Stockholm, Sweden, Swedish Pharmaceutical Press, 1997.

- 66- Garland, H.O., Balmentm R.J., Brimble, M.J. Oxytocin and renal function in the rat; an investigation of a possible proximal site of action. *Acta Endocrinol.* 1983;102:517-520.
- 67- Gibaldi, M., Perrier, D. *Pharmacokinetics, 2nd Edition, Revised and Expanded.* Marcel Dekker INC (éds.), New York, New York, USA, 1982.
- 68- Gimpl, G., Fahrenholz, F. The Oxytocin Receptor System: Structure, Fonction, and Regulation. *Physiol Rev.* 2001;81(2):629-683.
- 69- Ginsburg, M., Smith, M.W. The fate of oxytocin in male and female rats. *Br J Pharmacol Chemother.* 1959;14:327-33.
- 70- Gutkowska, J., Jankowski, M., Lambert, C., Mukaddam-Daher, S., Zingg, H.H., McCann, S.M. Oxytocin release atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *PNAS.* 1997;94:11704-11709.
- 71- Gutkowska, J., Jankowski, M., Mukaddam-Daher, S., McCann, S.M. Oxytocin is a cardiovascular hormone. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33:625-633.
- 72- Guzzi, F., Zanchetta, D., Cassoni, P., Guzzi, V., Francolini, M., Parenti, M., Chini, B. Localization of the human oxytocin receptor in calveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response. *Oncogene.* 2002;21:1658-1667.
- 73- Haawinckel, M.A., Elias, L.K., Favaretto, A.L.V., Gutkowska, J., McCann, S.M., Antunes-Rodrigues, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *PNAS.* 1995;92:7902-7906.
- 74- Han, J.S., Macda, Y., Knepper, M.A. Dual actions of vasopressin and oxytocin in regulation of water permeability in terminal collecting duct. *Am J Physiol.* 1993;265:F26-F34.

- 75- Heller, L.J., Mohrman, D.E. In: *Cardiovascular Physiology*. Richard W. Mixer (ed.), McGraw-Hill Book Company, New York, New York, U.S.A., 1981.
- 76- Higuchi, T., Honda, K., Fukuoka, T., Negoro, H., Wakabayashi, K. Release of oxytocin during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol.* 1985;105:339-346.
- 77- Homeida, A.M., Cooke, R.G. Biological half-life of oxytocin in the goat. *Res Vet Sci.* 1984;37:364-365.
- 78- Huang, W., Lee, S.L., Arnason, S.S., Sjöquist, M. Dehydration natriuresis in male rats is mediated by oxytocin. *Am J Physiol.* 1996;270:R427-R433.
- 79- Huang, W., Sjöquist, M., Skott, O., Stricker, E.M. Sved, A.F. Oxytocin-induced renin secretion in conscious rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2000;278:R226-R230.
- 80- Inoue, T., Kimura, T., Azuma, C., Inazawa, J., Takemura, M., Kiruchi, T., Kubota, Y., Ogita, K., Saji, F. Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *J Biol Chem.* 1994;269:32451-32456.
- 81- Ivell, R., Balvers, M., Rust, W., Bathgate, R., Einspanier, A. Oxytocin and male reproductive function. *Adv Exp Med Biol.* 1997;424:253-264.
- 82- Ivell, R., Balvers, M., Rust, W., Bathgate, R., Einspaner, A. Oxytocin and male reproductive function. *Adv Exp Med Biol.* 1997;424 253-264.
- 83- Jankowski, M., Danalache, B., Wang, D., Bhat, P., Hajjar, F., Marcinkiewicz, M., Paquin, J., McCann, S.M., Gutkowska, J. Oxytocin in cardiac ontogeny. *PNAS.* 2004;101(35):13074-13079.
- 84- Jankowski, M., Hajjar, F., Al Kawas, S., Mukaddam-Daher, S., Hoffman, G., McCann, S.M., Gutkowska, J. Rat heart :A site of oxytocin production and action. *PNAS.* 1998;95:14558-63.

- 85- Jankowski, M., Wang, D., Hajjar, F., Mukaddam-Daher, S., McCann, S.M., Gutkowska, J. Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. *PNAS*. 2000;97(11):6207-6211.
- 86- Jard, S., Barberis, C., Audigier, S., Tribollet, E. Neurohypophyseal hormone receptor systems in brain and periphery. *Prog Brain Res*. 1987;72:173-187.
- 87- Jarry, A., Renaudin, K., Denis, M.G., Robard, M., Buffin-Meyer, B., Karam, G., Buzelin, F., Paris, H., Laboisse, C.L., Vallette, G. Expression of NOS1 and soluble guanylyl cyclase by human kidney epithelial cells: morphological evidence for an autocrine/paracrine action of nitric oxide. *Kidney Int*. 2003;64:170-180.
- 88- Jeon, U.S., Joo, K.W., Na, Y.K., Kim, Y.S., Lee, J.S., Kim, J., Kim, G-H., Nielsen, S., Knepper, M.A., Han, J.S. Oxytocin induces apical and basolateral redistribution of aquaporin-2 in rat kidney. *Nephron Exp Nephrol*. 2003;93:e36-e45
- 89- Jones, P.M., Robinsson, I.C. Differential clearance of neurophysin and neurohypophyseal peptides from the cerebrospinal fluid in conscious guinea pigs. *Neuroendocrinology*. 1982;34:297-302.
- 90- Joo, K.W., Jeon, U.S., Kim, G-H., Park, J., Oh, Y.K., Kim, Y.S., Ahn, C., Kim, S., Kim, S.Y., Lee, J.S., Han, J.S. Antidiuretic action of oxytocin is associated with increased urinary excretion of aquaporin-2. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:2480-2486.
- 91- Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic, I., Grbovic, L. Effect of oxytocin as a partial agonist at vasoconstrictor vasopressin receptors on the human isolated uterine artery. *Br J Pharmacol*. 1997;121:1468-1474.
- 92- Kadekaro, M., Summy-Long, J.Y. Centrally produced nitric oxide and the regulation of body fluid and blood pressure homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000;27:450-459.

- 93- Kadekaro, M., Summy-Long, J.Y., Freeman, S., Harris, J.S., Terell, M.L., Eisenberg, H.M. Cerebral metabolic responses and vasopressin and oxytocin secretions during progressive water deprivation in rats (published erratum appears in the *American Journal of Physiology*:1992;262(Part 3): Section R following table of contents). *Am J Physiol.*: 1992;262(Part 2): R310-R317).
- 94- Keverne, E.B., Kendrick, K.M. Maternal-behavior in sheep and its neuroendocrine regulation. *Acta Paediatrica*. 1994;83(Suppl.397):47-56.
- 95- Keyser, Y.D., Auzan, C., Lenne, F., Beldjord, C., Thibonnier, M., Bertagna, X., Clauser, E. Cloning and characterization of the human V3 pituitary vasopressin receptor. *FEBS Lett*. 1994;356:215-220.
- 96- Kimura, T., Makino, Y., Saji, F., Takemura, M., Inoue, T., Kikuchi, T., Kubota, Y., Azuma, C., Nobunaga, T., Tokugawa, Y., Tanizawa, O. Molecular characterization of a cloned human oxytocin receptor. *Eur J Endocrinol*. 1994;131:385-390.
- 97- Kitchin, A.H., Lloyd, S.M., Pickford, M. Some actions of oxytocin on the cardiovascular system in man. *Clin Sci*. 1959;18:399-407.
- 98- Knepper, M.A., Inoue, T. Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin. *Current Opinion Cell Biol*. 1997;9:560-564.
- 99- Koch, M.A. Experimental modelling and research methodology. In: *The laboratory rat*. Second Edition. Suckow, M.A., Weisbroth, S.H., Franklin, C.L (eds.), American College of Laboratory Animal Medicine Series, New York, New York, U.S.A., 2006.
- 100- Kojro, E., Hackeberg, M., Zsigo, J., Farenholz, F. Identification and enzymatic deglycosylation of the myometrial oxytocin receptor using a radioiodinated photoreactive antagonist. *J Biol Chem*. 1991;266:21416-21421.
- 101- Kordower, J.H., Bodnar, R.J. Vasopressin analgesia: specificity of action and non-opioid effects. *Peptides*. 1984;7(4):747-756.

- 102- Kosfeld, M., Heinrichs, M., Zak, P.J., Fischbacher, U., Fehr, E. Oxytocin increases trust in humans. *Nature*. 2005;435(2):673-676.
- 103- Kostoglou-Athanassiou, I., Treacher, D.F., Forsling, M.L. Is oxytocin natriuretic in man? *J Endocrinol*. 1994;143(Suppl. O):39.
- 104- Kowalski, W.B., Diveky, L., Mehendale, R., Parsons, M., Wilson, L.Jr. Effect of pregnancy on the metabolic clearance rate and the volume of distribution of oxytocin in the baboon. *Am J Physiol*. 1998;274:E791-E795
- 105- Kuehnle, H.F., Dahl, K.V., Schmidt, F.H. Fully enzymatic inulin determination in small volume samples without deproteinization. *Nephron*. 1992;62:104-107.
- 106- Langraff, R., Malkinson, T., Horn, T., Veale, W.L., Lederis, K., Pittman, Q.J. Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular nucleus stimulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1990;258:R155-R159.
- 107- Laversen, N.H., Birnbaum, S.J. Water intoxication associated with oxytocin administration during saline-induced abortion. *Am J Obstet Gynecol*. 1975;121:2-6.
- 108- Leake, R.D., Weitzman, R.E., Fisher, D.A. Pharmacokinetics of oxytocin in the human subject. *Obstet Gynecol*. 1980;56(6):701-704.
- 109- LeBlanc, P-P., Aiache, J-M., Besner, J-G., Buri, P., Lesne, M. *Traité de Biopharmacie et Pharmacocinétique*, 3^{ème} édition, Paris, France, Éditions Vigot, 1997.
- 110- Lippert, T.H., Mueck, A.O., Seeger, H., Pfaff, A. Effects of oxytocin outside pregnancy. *Horm Res*. 2003;60:262-271.
- 111- Llóyd, S., Pickford, M. The action of posterior pituitary hormones and oestrogens on the vascular system of the rat. *J Physiol*. 1961;155:161-174.
- 112- Loichot, C., Krieger, J-P., De Jong, W., Nisato, D., Imbs, J-L., Barthelmebs, M. High concentrations of oxytocin cause vasoconstriction

- by activating vasopressin V1A receptors in the isolated perfused rat kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2001;363:369-375.
- 113- Lolait, S.J., O'Carroll, A.M., Brownstein, M.J. Molecular biology of vasopressin receptors. *Ann NY Acad Sci.* 1995;771:273-292.
- 114- Lundin, S., Broeders, A., Ohlin, M., Hansson, K., Bengtsson, H.I., Trojnar, J., Melin, P. Pharmacokinetic and pharmacologic properties of antiuterotonic oxytocin analogs in the rat. *J Pharmacol Exp Therap.* 1993;264(2):783-788.
- 115- Maeda, Y., Han, J.S., Gibson, C.C., Knepper, M.A. Vasopressin and oxytocin receptors coupled to Ca^{2+} mobilization in rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol.* 1993;265(1pt2):F15-F25.
- 116- Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., Nakaya, H., Kasanuki, H., Komuro, I. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(12):11384-11391.
- 117- Mayes, B.T., Shearman, R.P. Experience with synthetic oxytocin: the effects on the cardiovascular system and its use for the induction of labour and control of the third stage. *J Obstet Gynaecol Br Emp.* 1956;63:812-818.
- 118- McNeilly, A.S., Robinson, I.C., Houston, M.J., Howie, P.W. Release of oxytocin and prolactin in response to suckling. *Br Med J Clin Res.* 1983;Ed 286:257-259.
- 119- Michelini, L.C., Marcelo, M.C., Amico, J., Morris, M. Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H2269-H2276.
- 120- Miller, M.E., Davidge, S.T., Mitchell, B.F. Oxytocin does not directly affect vascular tone in vessels from nonpregnant and pregnant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H1223-H1228.

- 121- Mitchell, B.F., Fang, X., Wong, S. Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition? *Rev Reprod.* 1998;3:113-122.
- 122- Mukaddam-Daher, S., Jankowski, M., Wang, D., Menaouar, A., Gutkowska, J. Regulation of cardiac oxytocin system and natriuretic peptide during rat gestation and postpartum. *J Endocrinol.* 2002;175:211-216.
- 123- Mukaddam-Daher, S., Yin, Y.A., Roy, J., Gutkowska, J., Cardinal, R. Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin. *Hypertension.* 2001;38:292-296.
- 124- Nakamura, H., Itakura, A., Okamura, M., Ito, M., Iwase, A., Nakanishi, Y., Okada, M., Nagasaka, T., Mizutani, S. Oxytocin stimulates the translocation of oxytocinase of human vascular endothelial cells via activation of oxytocin receptors. *Endocrinol.* 2000;141(12):4481-85.
- 125- Nakano, J., Fisher, D.R. Studies on the cardiovascular effects of synthetic oxytocin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1963;142:206-214.
- 126- Nashold, B.S., Mannarino, E., Wunderlich, M. Pressor-depressor blood pressure responses in the cat after intraventricular injection of drugs. *Nature.* 1962;193:1297-1298.
- 127- Neath, P.J., Brown, D.C, Hughes, D., Perkowski, S.Z. The hemodynamic effects of intrathecal oxytocin in normal dogs. *Vet Anesthesia.* 2000;29:272-277.
- 128- Nicholson, H.D., Jenkin, L. Oxytocin and prostatic function. *Adv Exp Med Biol.* 1995;395:529-538.
- 129- O'Driscoll, K., Foley, M., MacDonald, D. Active management of labor as an alternative to cesarian section for dystocia. *Obstet Gynecol.* 1984;63:485-490.

- 130- Oliver, G., Schafer, E.A. On the physiological action of extracts of pituitary body and certain other glandular organs. *J Physiol.* 1895;18:277-279.
- 131- Organisation mondiale de la santé. (2005). *Preventing Chronic Diseases: A Vital Investment: A WHO Global Report*. Genève : Organisation mondiale de la santé. [L'OMS a estimé les valeurs de prévision à l'aide de méthodes types de maximisation de la comparabilité entre pays; il ne s'agit pas nécessairement des statistiques officielles des pays en cause.] Cité en : Conseil canadien de la santé (2006). Le renouvellement des soins de santé au Canada : frayer la voie de la qualité. www.healthcouncil.ca/fr/index.php
- 132- Ott, J., Scott, J.C. The galactogogue action of the thymus and corpus luteum. *Proc Soc Exp Biol.* 1910;8:49.
- 133- Paquin, J., Danalache, B., Jankowski, M., McCann, S.M., Gutkowska, J. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *PNAS.* 2002;99(14):9550-9555.
- 134- Perry, R.L., Satin, A.J., Barth, W.H., Valtier, S., Cody, J.T., Hankins, G.D.V. The pharmacokinetics of oxytocin as they apply to labor induction. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174(5):1590-1593.
- 135- Peters, G., Roch Ramel, F. Renal effects of posterior pituitary peptides and their derivatives. In : Hellet H. & Pickering B.T. (eds.) *Pharmacology of the Endocrine System and Related Drugs: the Neurohypophysis*. Pergamon Press, New York, New York, U.S.A., 1970:229-278.
- 136- Petersson, M. Cardiovascular effects of oxytocin. *Progr Brain Res.* 2002;139:281-288.
- 137- Petersson, M., Alster, P., Lundeberg, T., Uvnäs-Moberg, K. Oxytocin causes a long-term decrease of blood pressure in female and male rats. *Physiol Behavior.* 1996;60(5):1311-1315.

- 138- Petersson, M., Lundeberg, T., Uvnäs-Moberg, K. Oxytocin decreases blood pressure in male but not in female spontaneously hypertensive rats. *J Auton Nerv Syst.* 1997;66:15-18.
- 139- Petersson, M., Lundeberg, T., Uvnäs-Moberg, K. Short-term increase and long-term decrease of blood pressure in response to oxytocin – potentiating effect of female steroid hormones. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;33:102-108.
- 140- Plange-Rhule, J., Atherton, J.C., Drake, R., Kennon, S. The natriuretic effects of AVP and DDAVP: a lithium clearance study in conscious rats. *Acta Physiol Scand.* 1990;139(Suppl 591):38-39.
- 141- Postina, R., Kojro, E., Farenholz, F. Separate agonist and peptide antagonist binding sites of the oxytocin receptor defined by their transfer into the V2 vasopressin receptor. *J Biol Chem.* 1996;271:31593-31601.
- 142- Poulain, D.A., Wakerley, J.B. Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience.* 1982;7:773-808.
- 143- Prescott, L.F., Nimmo, W.S. *Drug Absorption, Proceedings of the Edinburg International Conference*, ADIS Press (eds.), New York, Tokyo, Mexico, Sydney, Aukland, Hong Kong, 1981.
- 144- Rasmussen, M.S., Simonsen, J.A., Sandgaard, N.C.F., Hoilund-Carslen, P.F., Bie, P. Effects of oxytocin in normal man during low and high sodium diets. *Acta Physiol Scand.* 2004;181:247-257.
- 145- Renaud, L.P., Bourque, C.W. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol.* 1991;36:131-169.
- 146- Rowland, M., Tozer, T.N. *Clinical Pharmacokinetics. Concepts and Applications*, 3^{ème} édition, Lea & Febiger (eds.), Philadelphie, U.S.A., 1995.

- 147- Royal London College of Obstetricians and Gynecologists. Why mothers die 1997-1999. *The fifth report on the confidential enquiries into maternal deaths in the United Kingdom*. London, RCOG Press, 2001.
- 148- Russ, R.D., Walker, B.R. Oxytocin augments baroreflex bradycardia in conscious rats. *Peptides*. 1994;15:907-912.
- 149- Sanborn, B.M., Dodge, K., Monga, M., Qian, A., Wang, W., Yue, C. Molecular mechanisms regulating the effects of oxytocin on myometrial intracellular calcium. *Adv Exp Med Biol*. 1998;449:277-286.
- 150- Sawyer, W.H. Posterior pituitary extracts and excretion of electrolytes by the rat. *Am J Physiol*. 1952;16:583-87.
- 151- Schiltz, J.C., Hoffman, G.E., Stricker, E.M., Sved, A.F. Decrease in arterial pressure activate oxytocin neurons in conscious rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 1997;273:1474-1483.
- 152- Schrier, R.W., Berl, T., Anderson, R.J. Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. *Am J Physiol*. 1979;236:321-332.
- 153- Seitchik, J., Amico, J., Robinson, A.G., Castillo, M. Oxytocin augmentation of dysfunctional labor IV: oxytocin pharmacokinetics. *Am J Obstet Gynecol*. 1984;150:225-228.
- 154- Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A.B.C. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 5^{ème} édition. The McGraw-Hill Company Inc. (eds.), Toronto, Ontario, Canada, 2005.
- 155- Silveira, P.F., Gil, J., Casis, L., Irazusta, J. Peptide metabolism and the control of body fluid homeostasis. *Curr Med Chem- Cardiovasc & Hematol Agents*. 2004;2:219-238.
- 156- Sjöquist, M., Huang, W., Jacobsson, E., SkØtt, O., Stricker, E.M., Sved, A.F. Sodium excretion and renin secretion after continuous versus pulsatile infusion of oxytocin in rats. *Endocrinology*. 1999;140(6):2814-2818.

- 157- Soares, T.J., Coimbra, T.M., Martins, A.R., Pereira, A.G.F., Carnio, E.C., Branco, L.G.S., Albuquerque-Araujo, W.I.C., De Nucci, G., Favaretto, A.L.V., Gutkowska, J., McCann, S.M., Antunes-Rodrigues, J. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *PNAS*. 1999;96:278-283.
- 158- Sofroniew, M.W. Vasopressin and oxytocin in the mammalian brain and spinal cord. *Trends Neurosci*. 1983;6:467-472.
- 159- Stam, W.B., Van der Graaf, P.H., Saxena, P.R. Characterization of receptors mediating contraction of the rat isolated small mesenteric artery and aorta to arginine vasopressin and oxytocin. *Br J Pharmacol*. 1998;25:865-873.
- 160- Stier, C.T., Manning, M., Sawyer, W.H. Effects of structural changes on the natriuretic activity of oxytocin analogs in conscious rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1980;164(2):167-172.
- 161- Stoeckel, M.E., Freund-Mercier, M.S., Falacios, J.M., Richard, P., Porte, A. Autoradiographic localization of binding sites for oxytocin and vasopressin in the rat kidney. *J Endocrinol*. 1987;113:179-182.
- 162- Stricker, E.M., Verbalis, J.G. Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophysial secretion in rats. *Am J Physiol*. 1986;250:R267-R275.
- 163- Suzuki, Y., Satoh, S., Kimura, M., Oyama, H., Asan, O.T., Shibuya, M., Sugita, K. Effects of vasopressin and oxytocin on canine cerebral circulation in vivo. *J Neurourg*. 1992;77:424-431.
- 164- Tagawa, T., Imaizumi, T., Endo, T., Shiramoto, M., Hirooka, Y., Ando, S-I., Takeshita, A. Vasodilatory effect of arginine vasopressin is mediated by nitric oxide in human forearm vessels. *J Clin Invest*. 1993;92:1483-1490.
- 165- Teitelbaum, I. Vasopressin-stimulated phosphoinositide hydrolysis in cultured rat inner medullary collecting duct cells is mediated by the oxytocin receptor. *J Clin Invest*. 1991;87:2122-2126.

- 166- Thibonnier, M., Conarty, D.M., Preston, J.A., Plesnicher, C.L., Dweik, R.A., Erzurum, S.C. Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinol.* 1999;140:1301-1309.
- 167- Tran, L.D., Montrastruc, J-L., Montrastruc, P. Effets of lysine-vasopressin and oxytocin on central cardiovascular control. *Br J Pharmacol.* 1982;77:69-73.
- 168- Tsujimoto, M., Hattori, A. The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. *Biochem Biophys Acta.* 2005;1751:9-18.
- 169- Uvnäs-Moberg, K. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinol.* 1998;23:819-835.
- 170- Uvnäs-Moberg, K., Ahlenius, S., Hillegaard, V., Alster, P. High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994;49:101-106.
- 171- Uvnäs-Moberg, K., Eriksson, M. Breastfeeding: physiological, endocrine and behavioural adaptations caused by oxytocin and local neurogenic activity in the nipple and the mammary gland. *Acta Paediat.* 1996;85:525-530.
- 172- Valtin, H., Schafer, J.A. *Renal function.* 3^{ème} édition. Little, Brown and Company Inc.(eds.), Toronto, Canada, 1983.
- 173- Vedernikov, Y.P., Betancourt, A., Wentz, M.J., Saade, G.R., Garfield, R.E. Adaptation to pregnancy leads to attenuates rat uterine artery smooth muscle sensitivity to oxytocin. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:252-260.
- 174- Verbalis, J.G., Mangione, M.P., Stricker, E.M. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinol.* 1991;128(3):1317-1322.
- 175- Wagner, J.G. *Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics,* Drug Intelligence Publications (eds.), Hamilton, Illinois, U.S.A., 1975.

- 176- Wagner, K.U., Young, W.S., Liu, X., Ginns, E.I., Li, M., Furth, P.A., Hennighausen, L. Oxytocin and milk removal are required for post-partum mammary-gland development. *Genes Funct.* 1997;1:233-244.
- 177- Wargent, E.T., Burgess, W.J., Laycock, J.F., Balment, R.J. Separate receptors mediate oxytocin and vasopressin stimulation of cAMP in rat inner medullary collecting duct cells. *Exp Physiol.* 1999;84:17-25.
- 178- Williams, J.R., Insel, T.R., Harbaugh, C.R., Carter, C.S. Oxytocin centrally administered facilitates formation of a partner preference in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *J Neuroendocrinol.* 2004;6:247-250.
- 179- Windle, R.J., Judah, J.M., Forsling, M.L. Do vasopressin and oxytocin have synergistic renal effects in the conscious rat ? *J Endocrinol.* 1995;144(3):441-448.
- 180- Yazawa, H., Hirasawa, A., Horie, K., Saita, Y., Iida, E., Honda, K., Tsujimoto, G. Oxytocin receptors expressed and coupled to Ca²⁺ signalling in a human vascular smooth muscle cell line. *Br J Pharmacol.* 1996;117:799-804.
- 181- Young, L.J., Wang, Z., Insel, T.R. Neuroendocrine bases of monogamy. *Trends Neurosci.* 1998;21(2):71-75.
- 182- Zingg, H.H., Laporte, S.A. The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14(5):222-227.

Annexe I –

Résultats de pharmacodynamique rénale : Effets sur la natriurèse, la kaliurèse et la diurèse

Tableau IX. Détails des groupes de rat et résultats de l'étude PD

Paramètres (Moy ± ET) (unité)	Dose (ng·kg ⁻¹)						
	Contôle saline	OT 300	OT 1000	OT 3000	OT 5000	OT 10000	ANP 5000
N	11	5	4	4	4	4	4
Poids	569,1 ^a ± 50,4	542,3 ^a ± 45,8	573,0 ^a ± 50,8	607,5 ^a ± 82,2	588,6 ^a ± 48,0	527,5 ^a ± 68,2	632,2 ^a ± 53,1
Diurèse (mL·hr ⁻¹)	0,40 ^a ± 0,13	0,50 ^a ± 0,22	0,65 ^b ± 0,14	0,99 ^b ± 0,23	0,47 ^a ± 0,25	0,56 ^a ± 0,18	2,23 ^b ± 1,38
Natriurèse (mmol·hr ⁻¹)	0,027 ^a ± 0,021	0,029 ^a ± 0,022	0,036 ^a ± 0,033	0,129 ^b ± 0,072	0,026 ^a ± 0,016	0,058 ^a ± 0,034	0,387 ^b ± 0,252
Kaliurèse (mmol·hr ⁻¹)	0,058 ^a ± 0,031	0,102 ^b ± 0,052	0,166 ^b ± 0,099	0,195 ^b ± 0,095	0,065 ^a ± 0,044	0,064 ^a ± 0,023	0,166 ^b ± 0,045

Les lettres en exposant, différentes pour chaque ligne, correspondent à des différences significatives.

Figure 14. Diurèse observée suite à l'administration de différentes doses *i.v.* d'ocytocine

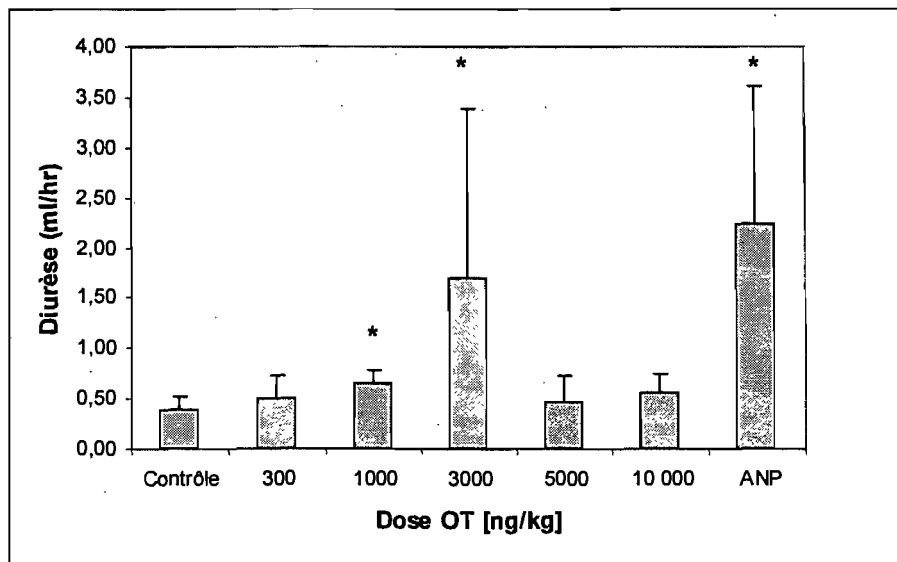


Figure 14. Diurèse chez les rats ayant reçu un bolus *i.v.* d'OT aux doses de 300 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ à 10000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT, chez le groupe contrôle positif ayant reçu un bolus *i.v.* de 5000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ ANP et chez le groupe contrôle négatif ayant reçu un bolus *i.v.* de saline physiologique 0,9%. Les groupes ayant reçu un bolus *i.v.* de 1000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT, 3000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT et 5000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ ANP sont significatifs pour la diurèse, **comparativement au groupe contrôle saline (* $p = 0.01$)**. À partir de la dose de 5000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT, aucune hausse de la diurèse n'est observée et cette absence d'effet est maintenue à 10000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT également. Le groupe ANP a été utilisé car il est un puissant agent connu pour causer la natriurèse et la diurèse, il sert ainsi de référence positive à nos mesures de détection. Le groupe ANP est statistiquement significatif pour la diurèse comparativement aux autres groupes OT ($p=0.0005$), sauf pour le groupe de dose 3000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT, qui n'est statistiquement pas différent du groupe ANP ($p=0.35$). Il est intéressant de remarquer l'absence d'effet sur la diurèse aux hautes doses d'OT de 5000 et de 10000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$. * $p = 0.01$

Figure 15. Natriurèse et kaliurèse suite à l'administration de différentes doses i.v. d'ocytocine

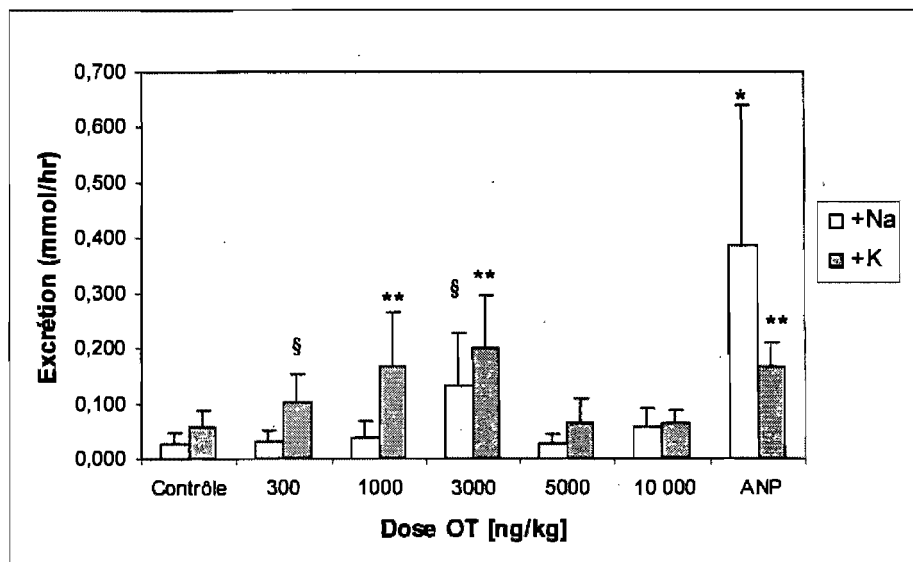


Figure 15. Excrétion urinaire du sodium (Na^+) et du potassium (K^+) chez les groupes de rats ayant reçu différentes doses d'OT, de $300 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ à $10000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ administrée en bolus *i.v.*, chez le groupe contrôle positif ayant reçu un bolus *i.v.* de $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ ANP et chez le groupe contrôle négatif ayant reçu un bolus *i.v.* de saline physiologique 0,9%.

Le groupe ANP a démontré des différences significatives dans la natriurèse, comparativement à tous les groupes OT avec $* p < 0,0001$, à l'exception du groupe de dose $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT, où la valeur de $p = 0,003$. Il est à noter que l'excrétion de Na^+ a tendance à augmenter avec la dose d'OT, **comparativement au groupe contrôle négatif**, atteignant un maximum à la dose de $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ (§ $p = 0,04$). Cependant, à partir de la dose de $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT, nous observons une diminution marquée de la natriurèse, qui est aussi concomittante avec la diminution de la diurèse (Figure 14). $* p < 0,0001$, § $p = 0,04$.

En ce qui concerne la kaliurèse, un effet significatif a été noté pour les groupes ayant reçu $300 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT (§ $p = 0,04$), $1000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT (** $p < 0,005$), $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT ($p = 0,0003$) et $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ ANP (** $p < 0,005$), comparativement au groupe contrôle saline. Il est à remarquer que la kaliurèse augmente avec la dose d'OT, comme pour la natriurèse, jusqu'à un maximum à $3000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT et qu'à partir

de la dose de $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT, nous observons une diminution marquée de la kaliurèse. Par ailleurs, le groupe ANP a observé des contrastes comparativement aux groupes de doses $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT ($p = 0.03$) et $10000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT ($p = 0.02$), signifiant que la kaliurèse observée à ces deux dernières doses est d'une part comparable à celle du groupe contrôle négatif, et d'autre part, est significativement moins élevée que le group ANP positif. Ces résultats appuyent l'hypothèse d'une diminution d'effet de l'OT sur la fonction rénale à partir de $5000 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ OT. ** $p < 0.005$, ^s $p = 0.04$.