

Le glucagon interfère avec la liaison et l'action de la parathormone sur la production d'AMPc, au niveau des ostéoblastes de rats *in vitro*

Aboubaker EL HESSNI*[♦], Abdelhalim MESFIOUI*, Abdelrhani MOKHTARI* &
Mohamed Khaled CHOULLI*

(Reçu le 18/05/1994 ; Accepté le 04/07/1994)

تفاعل الكليكاكون مع الرابطة و أثر (parathormone) على إنتاج (AMPc) عند خلية التعظم لدى الفئران
(inVtro)

لقد توصلنا في هذا البحث إلى وجود تنافس بين الكليكاكون وحامّة الغدة جار الدرقية على الترابط مع موقع ذي تجانس ضعيف في خلية التعظم. دراسة وقع الكليكاكون على إنتاج الأدينوزين مونوفوسفات الدوري تبين بأن لاتأثير مباشر له على هذا الإنتاج. لكن الكليكاكون يرفع من تأثير حامّة الغدة جار الدرقية على هذا الإنتاج وذلك بصفة مرتبطة بمقدار الكليكاكون المستعمل. تأثير الكليكاكون خاص بحامّة الغدة جار الدرقية لأنه لا يغير من تأثير الفورسكولين و البروستاكلاندين على إنتاج الأدينوزين مونوفوسفات الدوري. قد يكون لهذه النتائج علاقة مع قدرة الكليكاكون على حصر نخر العظم الناتج عن تأثير حامّة الغدة جار الدرقية.

الكلمات المفتاحية : الكليكاكون - حامّة الغدة جار الدرقية - الأدينوزين مونوفوسفات الدوري - الترابط - خلية التعظم.

Le glucagon interfère avec la liaison et l'action de la parathormone sur la production d'AMPc, au niveau des ostéoblastes de rats *in vitro*

Des expériences de liaison et de production de l'AMPc par le glucagon et la parathormone (PTH) ont été effectuées *in vitro* au niveau des ostéoblastes de rat. Les résultats montrent que le glucagon entre en compétition avec la PTH pour un site de faible affinité. Ces deux hormones se lient à ce site avec la même affinité. L'étude de leur effet sur la génération d'AMPc montre que si le glucagon n'a aucun effet par lui même, en présence de la PTH, l'action de cette hormone sur la production de l'AMPc est potentialisée. Cette potentialisation est dose-dépendante et ne s'observe qu'en présence du glucagon et de la PTH. En effet, l'action de la prostaglandine E1 et de la forskoline sur la production d'AMPc n'est pas modifiée par le glucagon. Ces résultats sont à relier avec le fait que le glucagon s'est montré capable d'inhiber la résorption osseuse induite par la PTH.

Mots clés: Glucagon - Parathormone - Liaison AMPc - Ostéoblastes - *In vitro* - Rat

Interaction of glucagon with the parathormone binding and action in rat osteoblasts *in vitro*

This study showed that glucagon competes with parathormone (PTH) for a low affinity site in rat osteoblast cells *in vitro*. Both glucagon and PTH bind to this site with a same affinity. Glucagon alone has no action on cAMP production by osteoblasts. However, it is able to potentiate the PTH stimulation of cAMP production in a dose dependent fashion. This effect is specific to PTH, since glucagon has no effect on prostaglandine E1 and forskoline stimulation of cAMP production by osteoblasts. This results should be related to the inhibition by glucagon of PTH induced bone resorption.

Key words: Glucagon - Parathormone - Binding- cAMP - Osteoblasts - *In vitro* - Rat

* Unité de Pharmacologie et Toxicologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, 14000, Kénitra, Maroc

[♦] Auteur correspondant

INTRODUCTION

La résorption osseuse est un processus complexe mettant en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires comme les ostéoblastes (assurant la formation de l'os) et les ostéoclastes (assurant de la résorption osseuse). Les hormones induisant la résorption osseuse, comme la parathormone (PTH), agissent sur les ostéoblastes et non pas sur les ostéoclastes. Cette action commence par une liaison au niveau de sites spécifiques, suivie de la stimulation de l'adénylcyclase (Chase *et al.*, 1969; Farndale *et al.*, 1988 ; Vaes, 1968) et de la phospholipase C (Civitelli *et al.*, 1989 ; Farese *et al.*, 1980 ; Yamagawa *et al.*, 1986).

Le glucagon agit au niveau de l'os en inhibant la résorption osseuse induite par la parathormone (Stern & Bell, 1970). Le mécanisme d'action par lequel cette hormone pancréatique hyperglycémisante induit cet effet n'a pas été élucidé. L'analyse de l'interaction du glucagon avec la PTH au niveau des ostéoblastes *in vitro* fournirait des informations concernant l'inhibition par le glucagon de la résorption osseuse induite par la PTH.

Au cours de ce travail, on se propose d'étudier, au niveau des ostéoblastes, l'effet du glucagon sur la liaison de la PTH marquée à l'iode et son effet sur la production d'AMPc, en absence et en présence de la PTH, la forskoline ou la prostaglandine E (PGE1).

L'interaction du glucagon avec la PTH a été également observée au niveau des hépatocytes de rat où la PTH, à doses élevées, inhibe la liaison du glucagon marqué à l'iode (Shah *et al.*, 1987).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Culture des ostéoblastes de rat

La culture des cellules osseuses est réalisée selon la méthode décrite par Teitelbaum *et al.*, (1986). Les fragments d'os sont incubés dans des boîtes de culture de 10 cm de diamètre contenant du BGJb modifié contenant 100 UI de pénicilline, 50 mg/ml de streptomycine et 2,5 mg/ml de fongisone (milieu complet). Les biopsies sont coupées en petits fragments et chaque fragment est transféré dans 10 ml de milieu complet additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et incubé à 37°C à 5% de CO₂ pendant 48 h pour permettre la migration des cellules. Après cette première incubation, les

fragments osseux sont éliminés par filtration et le filtrat (milieu + cellules) est centrifugé, le culot composé des cellules est resuspendu dans le milieu de culture complet contenant 10% de SVF, à une densité de 10⁶ cellules/puits de 35 mm de diamètre jusqu'à confluence (4 à 5 semaines). Ensuite, le milieu est changé toutes les 48 h. Les tests sont réalisés sur les cellules entre le 4^{ème} et le 10^{ème} passage de la culture cellulaire.

2. Détermination de la production d'AMPc

La détermination de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) est réalisée selon la méthode décrite par El Hessni *et al.* (1993). Le milieu de culture est aspiré et remplacé par 250 ml de milieu complet contenant 0,1% d'albumine sérique de bœuf (BSA), 1mM d'isobutylméthylxanthine (IBMX, SIGMA). La stimulation est réalisée en ajoutant soit:

- la hPTH(1-34) à une concentration de 300 ng/ml d'acide acétique 10 mM contenant 0,1% de BSA en absence et en présence de glucagon (1-29) de porc à des concentrations de 0, 100, 200, 300, 600 et 1000 ng/ml du même solvant que la PTH.
- la prostaglandine E1(PGE1) (SIGMA) ou la forskoline à une concentration finale de 100 mM en absence et en présence de glucagon à des concentrations de 300, 600 et 1000 ng/ml.

Après une incubation de 7 min à température ambiante, les cellules sont rincées au PBS, et l'AMPc est extrait par 2 x 250 ml d'éthanol absolu. L'alcool est éliminé à l'aide de l'air comprimé, et après reconstitution dans le tampon de dosage, l'AMPc est déterminé en utilisant une protéine de la membrane d'érythrocytes liant l'AMPc selon la méthode de Gilman (1970). Les protéines totales sont déterminées suivant la méthode de Lowry *et al.* (1951). Les résultats sont exprimés en pmol d'AMPc/100 mg de protéines.

3. Effet du glucagon sur la liaison de la PTH (1-34) aux ostéoblastes de rat

La PTH est marquée à l'iode 125 selon la méthode décrite par Silve *et al.* (1990). Après aspiration du milieu de culture et addition de 250 ml de milieu complet avec 0,1% de BSA (albumine de bœuf), 1 mM d'IBMX, la liaison est testée en présence de 1 à 1,5.10⁴ cpm de ¹²⁵IPTH dans 5 µl d'acide acétique 10 mM avec 0,1% de BSA et des concentrations différentes de glucagon ou de hPTH(1-34) non marqués ou autres peptides (insuline, calcitonine, ACTH et somatostatine). Tous ces produits sont dilués dans de l'acide acétique 10 mM avec 0,1% de BSA.

Après 30 min d'incubation à température ambiante, le milieu d'incubation est aspiré et la radioactivité non liée aux cellules est déterminée à l'aide d'un compteur de radioactivité γ . Quant à la radioactivité liée aux cellules, elle est déterminée, après rinçage des cellules 3 fois par du PBS froid, solubilisation dans 0,5 ml de NaOH 0,5N. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité liée aux cellules par rapport à la radioactivité totale ajoutée par 100 mg de protéines. La liaison totale est celle obtenue en absence de tout peptide non marqué. Le taux d'hormone marquée dégradée par les ostéoblastes après incubation est déterminée en ajoutant 100 mg de BSA et un même volume de TCA au milieu d'incubation. Chaque échantillon est centrifugé (1000 x g pendant 1 min) et la radioactivité dans le culot (hormone intacte) et dans le surnageant (hormone dégradée) est mesurée. Après 30 min d'incubation le taux de dégradation est de l'ordre de 10%.

RÉSULTATS

1. Effet du glucagon sur la liaison de ^{125}I PTH aux ostéoblastes de rats *in vitro*

On a démontré précédemment *in vitro* (El Hessni *et al.*, 1993) que le glucagon entre en compétition avec la PTH pour un site de faible affinité n'interagissant pas avec le système adénylcyclase, aussi bien au niveau des fibroblastes cutanés humains entiers que sur des fractions membranaires.

Les résultats présentés dans ce travail montrent que le glucagon inhibe la liaison de la PTH marquée à l'iode aux ostéoblastes de façon dose dépendante (Figure 1).

Conformément à ce qu'on a obtenu sur les fibroblastes, le glucagon présente la même capacité que la PTH non marquée à inhiber cette liaison (Figure 1). Ainsi, 50% de l'inhibition de la liaison spécifique est obtenue à des concentrations similaires de glucagon et de PTH (300 ng/ml environ). Cette concentration est comparable à celle qu'on a déjà obtenue sur les fibroblastes cutanés (El Hessni *et al.*, 1993). Ceci suggère que les sites de fixation du glucagon sur les fibroblastes et ostéoblastes seraient identiques: sites de faible affinité non liés directement au système adénylcyclase.

Cet effet est propre au glucagon, puisque d'autres peptides tels que l'insuline, la calcitonine, la

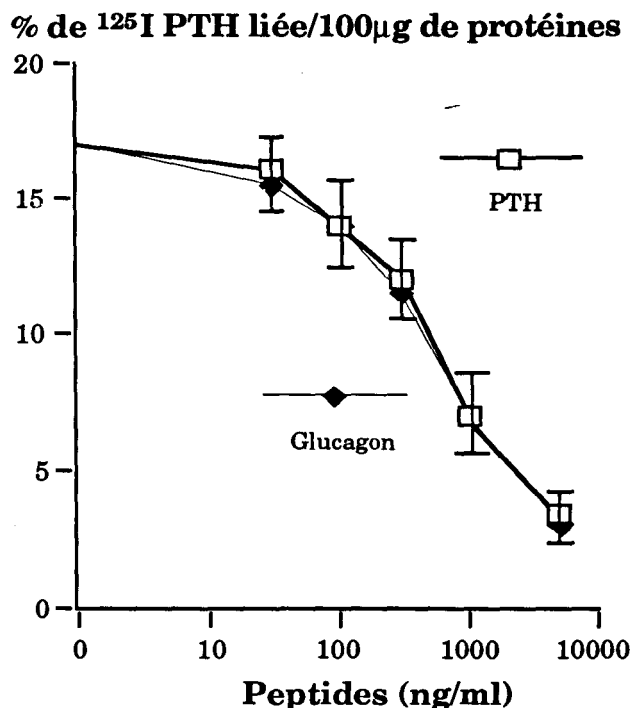


Figure 1. Effets des doses croissantes de PTH et glucagon non marqués sur la liaison de la PTH radioiodée aux ostéoblastes de rat *in vitro* (moyenne \pm SD de 3 expériences en triple)

somatostatine et l'ACTH, à des doses de 10 000 ng/ml, ne modifient pas cette liaison (résultats non montrés).

2. Effet du glucagon sur la production d'AMPc par les ostéoblastes

Les résultats présentés ci-dessus montrent que le glucagon entre en compétition avec la PTH au niveau de son site de liaison. Il était intéressant de voir si le glucagon modifierait la production d'AMPc par ces cellules, d'abord lui seul, puis en présence de la PTH, la forskoline ou la prostaglandine E1.

• Effet du glucagon sur la production d'AMPc

Les résultats montrent que le glucagon seul n'a aucun effet sur la production d'AMPc (Tableau 1).

En effet, la production d'AMPc est de l'ordre de 2.5 à 3 pmol/ 100 mg de protéines en présence et en absence de 10 à 1000 ng/ml de glucagon. Ce résultat suggère que le glucagon se fixe sur un site n'interagissant pas avec le système adénylcyclase.

Tableau 1. Effet du glucagon (en ng/ml) sur la production d'AMPc (en pmol d'AMPc par 100 mg de protéines) par les ostéoblastes de rat *in vitro* (moyenne \pm SD de 3 expériences en triples)

Glucagon	0	100	300	1000
AMPc	2,5 \pm 0,1	3 \pm 0,15	2,5 \pm 0,2	2,8 \pm 0,1

• Effet du glucagon sur la stimulation de l'AMPc par la PTH

L'effet de la PTH seule sur la production d'AMPc au niveau des ostéoblastes est dose-dépendante avec un maximum à 300 ng/ml. L'incubation des ostéoblastes avec la PTH (de 0 à 1000 ng/ml) et le glucagon (300 ng/ml) simultanément montre que le glucagon augmente l'action de la PTH sur la production d'AMPc (Figure 2).

Cet effet est dose-dépendante et s'observe à partir de 100 ng/ml de glucagon avec un maximum à 300 ng/ml (résultat non montré). Ainsi, la production d'AMPc en présence de 300 et 1000 ng/ml de PTH seule est la même (85 pmole/100 mg de protéines),

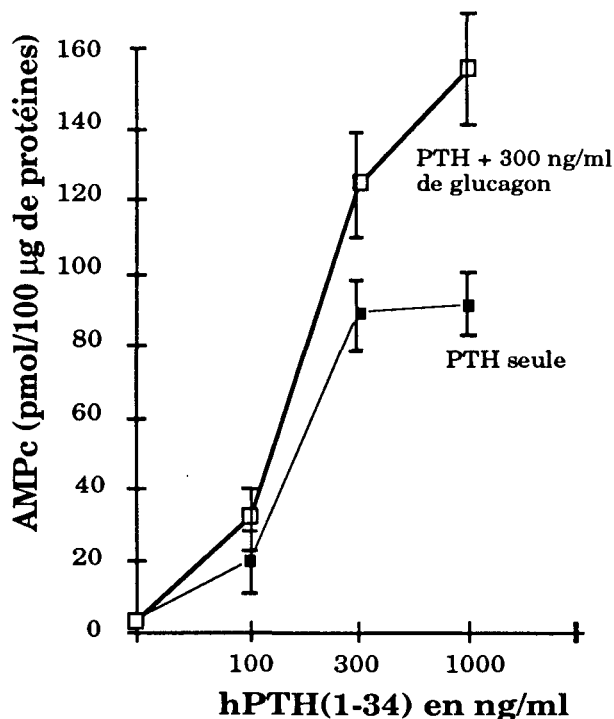


Figure 2. Effets de 300 ng/ml de glucagon sur la stimulation de la production d'AMPc par des doses croissantes de PTH sur les ostéoblastes de rat *in vitro* (moyenne de 3 expériences en triple)

alors qu'en présence de 300 ng/ml de glucagon, la production d'AMPc est de 124 et 150 pmole/100 mg de protéines respectivement. Ceci correspond à une augmentation de 42% pour 300 ng/ml de PTH et à une augmentation de 75% pour 1000 ng/ml de PTH.

L'interaction de l'effet de la PTH et du glucagon sur la réponse AMPc des ostéoblastes est exclusive pour ces deux hormones. L'action dose-dépendante du glucagon sur la réponse en terme d'AMPc n'est pas observée en présence de PGE1 ou de la forskoline comme cela est illustré sur les figures 3 et 4.

DISCUSSION

Stern & Bell (1970) ont montré que le glucagon inhibe la résorption osseuse induite par la PTH. Le mécanisme d'action de cet effet n'a pas été élucidé. Les données de la littérature montrent que la PTH induit la résorption osseuse en se fixant sur un site spécifique et en stimulant l'adénylcyclase (Chase *et al.*, 1969; Farndale *et al.*, 1988; Vaes, 1968) et la phospholipase C (Civitelli *et al.*, 1989; Farese *et al.*, 1980, Yamagawa *et al.*, 1986).

Afin d'examiner l'interaction du glucagon avec l'effet de la PTH sur les ostéoblastes, on a étudié l'interférence du glucagon avec la liaison de la PTH et avec la production de l'AMPc sur ces cellules. Concernant le premier point, nos résultats montrent que le glucagon inhibe la liaison de la PTH, marquée à l'iode, aux ostéoblastes. Le glucagon présente la même capacité que la PTH non marquée à inhiber cette liaison. On avait déjà obtenu le même résultat sur les fibroblastes cutanés (autres cellules cibles de la PTH) dans un travail précédent (El Hessni *et al.*, 1993) où on avait démontré que la PTH se fixe sur deux types de sites : une première classe de sites de haute affinité, de poids moléculaire de 60 kDa, qui seraient impliqués dans la stimulation de l'AMPc par la PTH et une deuxième classe de sites de basse affinité, de poids moléculaire de 95 kDa, qui reconnaissent la PTH et le glucagon.

L'interaction du glucagon et de la PTH a été également décrite par Shah *et al.* (1987). Ces auteurs ont montré que la PTH, mais pas la sécrétine, inhibe la liaison du glucagon radio-iodé aux hépatocytes de rat *in vitro*. Ils ont montré également qu'une similitude de structure secondaire entre les deux hormones, mise en évidence par dichroïsme circulaire, serait à l'origine de cette interaction.

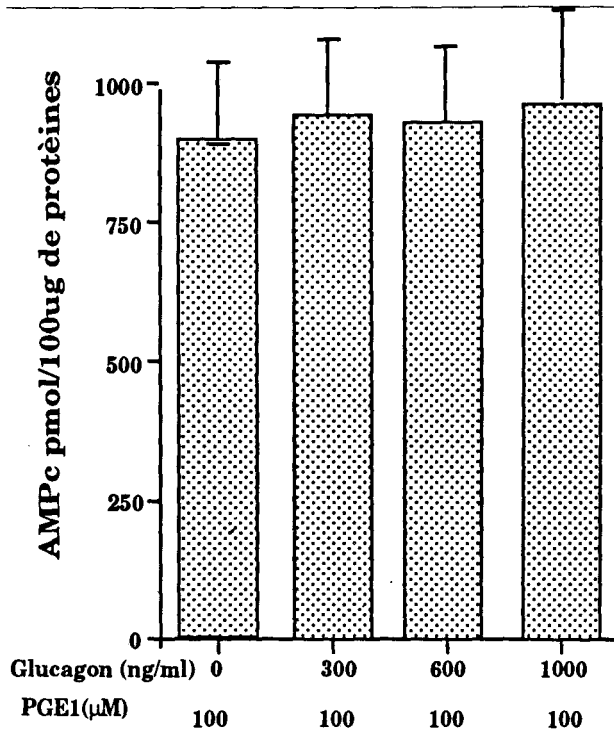


Figure 3. Effets des doses croissantes de glucagon sur la stimulation de la production d'AMPc par 100 μM de prostaglandine E1 sur les ostéoblastes de rat *in vitro* (moyenne \pm SD de 3 expériences en triple)

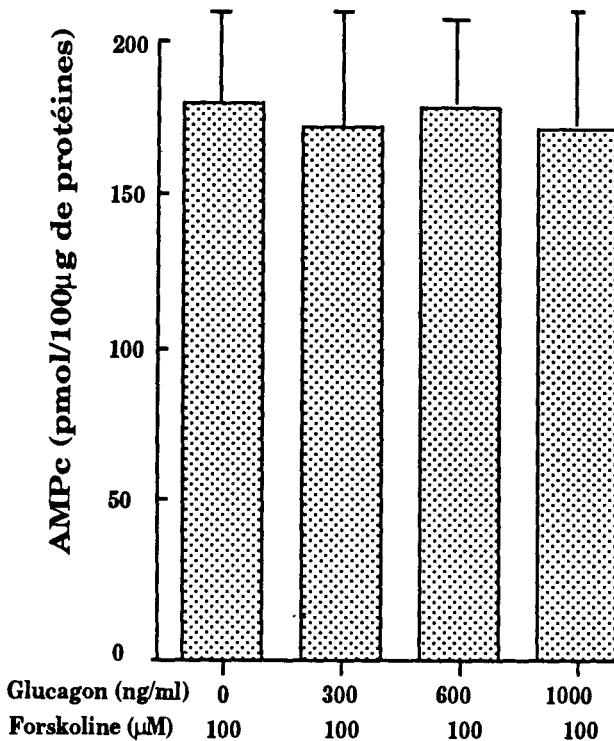


Figure 4. Effets des doses croissantes de glucagon sur la stimulation de la production d'AMPc par 100 μM de forskoline sur les ostéoblastes de rat *in vitro* (moyenne \pm SD de 3 expériences en triple)

Les résultats de cette étude montrent que le glucagon seul n'a pas d'effet sur la production d'AMPc. En revanche, la présence du glucagon et de la PTH induit une potentialisation de la génération de l'AMPc.

Puisque le glucagon seul n'a pas d'effet sur la production d'AMPc, son effet sur la potentialisation passerait par une autre voie de transduction.

On pourrait supposer un effet inhibiteur du glucagon sur les protéines G_i du système adénylate-cyclase via la stimulation de la phospholipase C et de la protéine kinase C. Cette hypothèse trouverait un appui dans un travail décrit par Pyne *et al.* (1989) dont les résultats montrent que le glucagon inhibe les protéines G_i du système adénylate-cyclase à la suite d'une phosphorylation par l'intermédiaire de la phospholipase C et la protéine kinase C. Cet effet du glucagon pourrait être à l'origine de la potentialisation de l'action de la PTH sur la production d'AMPc par les ostéoblastes démontrée dans ce travail.

En faveur de cette hypothèse, une étude récente (Klein *et al.*, 1991) a montré que la pertussis toxine (toxine bactérienne inhibant les protéines de couplage G_i) inhibe la résorption osseuse induite par la PTH, mais augmente la stimulation d'AMPc induite par la PTH sur les ostéoblastes *in vitro*, sans modifier la réponse de ces cellules à la forskoline. Ceci suggère que les deux agents (glucagon et toxine bactérienne) agiraient par le même mécanisme d'action qui serait, entre autres, l'inhibition des protéines de couplage G_i .

Cependant, il est difficile de concilier entre l'inhibition par le glucagon de la résorption osseuse induite par la PTH d'une part, et la potentialisation par le glucagon de l'effet de la PTH sur l'AMPc, d'autre part.

Dans la littérature, les études sur la contribution de l'AMPc dans la résorption osseuse induite par la PTH ont abouti à des résultats contradictoires.

En effet, en analysant l'action de la forskoline sur la production d'AMPc et sur la résorption osseuse induite par la PTH, Lerner *et al.* (1986) ont montré qu'en dépit d'une forte stimulation de la production d'AMPc dans l'os et dans les ostéoblastes, la forskoline, à court terme (traitement de 24 h), inhibe fortement la résorption osseuse induite par

la PTH, alors qu'un traitement de 120 h produit un effet inverse. Ces résultats suggèrent que la résorption immédiate induite par la PTH ne met pas en jeu l'AMPc. Ce dernier serait mis en jeu dans l'action à long terme de la PTH sur la résorption osseuse. On peut notamment supposer qu'il intervient dans le recrutement des ostéoclastes responsables de la résorption osseuse.

En conclusion, le glucagon entre en compétition avec la PTH pour un site de faible affinité au niveau des ostéoblastes de rat *in vitro*. Ce site n'interagit pas avec l'adénylcyclase. Le glucagon seul, sans effet sur la production d'AMPc, augmente la réponse des ostéoblastes à la PTH en terme de stimulation d'AMPc. Cet effet passerait par la stimulation de la PKC et l'inhibition des protéines de couplage Gi.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Chase L.R., Fedak S.A. & Aurbach G.D. (1969) Activation of skeletal adenylcyclase by parathyroid hormone *in vitro*. *Endocrinology* 84:761-768
- Civitelli R., Martin T.J., Fausto A., Gunsten S.L., Hruska K.A. & Avioli L.V. (1989) Parathyroid hormone-related peptide transiently increases cytosolic calcium in osteoblast-like cells: comparaison with parathyroid hormone. *Endocrinology* 125: 1204-1210
- El Hessni A., Hautier F. & Silve C. (1993) Parathyroid hormone and glucagon compete for binding to low affinity sites on human skin fibroblasts. *Molecular & Cellular Endocrinology* 92:183-188
- Farese R.V., Bidot-Lopez P., Sabir A., Smith J.S., Schinbeckler B. & Larson R. (1980) Parathyroid hormone acutely increases polyphospho-inositides of rabbit kidney cortex by acycloheximide sensitive process. *J. Clin. Inv.* 65:1523-1526
- Farndale R.W., Sandy J.R., Atkinson S.J., Pennington S.R. & Meghji S.C. (1988) Parathyroid hormone and prostaglandine E1 stimulates both inositol phosphates and cyclic AMP accumulation in mouse osteoblastes cultures. *Biochem. J.* 252 : 263-268
- Gilman A.G. (1970) A protein binding assay for adenosine 3'5'-cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. U. S. A.* 67:305-312
- Klein R.F., Nissenson R.A) & Strewler G.J. (1991) Pertussis toxin inhibits hormonal stimulation of bone resorption in fetal rat limb bones. *J. Pharm. Exper. Ther.* 258:877-881
- Lerner U.H., Fredholm B.B. & Ransjö (1986) Use of forskolin to study the relationship between cyclic AMP formation and bone resorption *in vitro*. *Biochem. J.* 240:529-539
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
- Pyne N. J., Murphy G.J., Milligan G. & Houslay M.D. (1989) Treatment of intact hepatocytes with either the phobol ester TPA or glucagon elicits the phosphorylation and functional inactivation of the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi. *FEBS.* 243:77-82
- Shah G.V., Epand R.M. & Orłowski R.C. (1987) Conformational determinants in receptor recognition of peptide hormone: interaction of parathyroid hormone with the glucagon receptor. *Molecular & Cellular Endocrinology* 49:203:210
- Silve (C.), Suarez F., El Hessni A., Loiseau A.M., Graulet A.M. & Gueris J. (1990) The resistance to parathyroid hormone of fibroblasts from some patients with type Ib pseudohypoparathyroidism is reversible with dexamethasone. *J. Clin. Endoc. Metab.* 71:631-638
- Stern P.H. & Bell N.H. (1970) Inhibition by glucagon of parathyroid hormone induced Ca-45 release from embryonic rat bone *in vitro*. *Endocrinology* 87:111-117
- Teitelbaum A.P., Silve C.M., Nyiredy K.O. & Arnaud C.D. (1986) Down regulation of parathyroid hormone (PTH) receptors in cultured bone cells in associated with agonist-specific intracellular processing of PTH-receptor complex. *Endocrinology* 118: 595-602
- Vaes G. (1968) Parathyroid hormone -Like action of N6, 2-0-dibutyryl adenosine-3', 5' (cyclic) monophosphate on bone explants in tissue culture. *Nature* 219: 939-940
- Wakelam M.J.O., Murphy G.J., Hurby V.J. & Houslay M.D., (1986) Activation of tow signal transduction systems in hepatocytes by glucagon. *Nature* 323:68-71