

## ETUDE *IN VITRO* DE LA SYNTHÈSE DE LA PROGESTERONE DANS LE CORPS JAUNE CYCLIQUE HUMAIN: RÔLE DE LA PROSTAGLANDINE F2 $\alpha$

Agostinho Almeida SANTOS\*, Claude HERMIER\*\* et Albert NETTER\*

\* Service d'Endocrinologie – Gynécologie et Reproduction humaine,  
Hôpital Necker, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France

\*\* Laboratoire des Hormones Polypeptidiques, CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Received 22 May 1972

The action of prostaglandin F2 $\alpha$  on human cyclic corpus luteum was investigated *in vitro*. PG F2 $\alpha$  stimulates the synthesis of progesterone in this tissue and cyclic-AMP seems to be the intracellular mediator of its action.

When HCG and PG F2 $\alpha$  are added into the medium at their "maximal effective dose" the effect is supra-maximal. In our experimental procedure, acetylsalicylic acid does not inhibit the synthesis of progesterone stimulated by LH. According to these results it seems that PG F2 $\alpha$  is not the necessary membrane mediator between the hormonal-receptor and the adenylcyclase system.

### 1. Introduction

Parmi les multiples actions des prostaglandines sur différents types de corps jaunes, on peut citer *in vitro* des effets lutéotropes (Pharriss et al. [1], Speroff et Ramwell [2]) et *in vivo* des effets lutéolytiques (Pharriss et Wyngarden [3], Blatchley et Donovan [4], McCracken et al. [5]). Cependant le rôle exact des prostaglandines, substances ubiquitaires, dans le mécanisme d'action hormonale n'est pas encore connu (Bergström [6], Ramwell et Shaw [7]).

A la suite de nos travaux *in vitro* concernant le mécanisme d'action de la gonadotropine chorionique (HCG) sur le corps jaune humain (Hermier et al. [8], 1972) il nous a paru important d'étudier le rôle éventuel de la prostaglandine F2 $\alpha$  sur notre système. On sait, en effet, que la prostaglandine F2 $\alpha$  administrée pendant la phase lutéale chez le singe (Kirton et al. [9]) et chez la femme (Jones et Wentz [10]) ne semble pas avoir d'action lutéolytique, contrairement à ce qui a été montré pour les espèces inférieures; de plus Marsh et Lemaire [11] ont décrit récemment un effet stéroïdogénique de la prostaglandine F2 $\alpha$  *in vitro* sur le corps jaune cyclique humain. Dans ce dernier cas, l'augmentation de la sécrétion de la progestérone semble être en rapport avec un accroissement du taux de l'cAMP, consécutif à une stimulation de

l'adénylcyclase induite par la prostaglandine (Marsh [12], Marsh et Lemaire [11]). On est ainsi amené à imaginer une situation analogue à celle observée après une stimulation du tissu lutéal par l'HCG (Marsh et Lemaire [11], Hermier et al. [8], 1972). Par conséquent, l'cAMP pourrait être l'intermédiaire intracellulaire de l'action hormonale et de l'effet stéroïdogénique de la prostaglandine F2 $\alpha$  *in vitro*.

Nous avons étudié l'action *in vitro* de la PG F2 $\alpha$  sur le corps jaune et nous avons envisagé la possibilité d'une intervention des prostaglandines entre le récepteur hormonal et l'adénylcyclase. En effet le rôle éventuel des prostaglandines comme médiateur de l'action hormonale a été montré par certains auteurs (Pharriss et al. [1], Speroff et Ramwell [2], Kuehl et al. [13]) mais nié catégoriquement par d'autres (Marsh [14]).

### 2. Matériel et méthodes

Les préparations hormonales suivantes ont été utilisées: la gonadotropine chorionique humaine (HCG) à 14 100 UI/mg préparée et offerte par Organon (Oss., Hollande), la [4-<sup>14</sup>C] progestérone à 29.3 Ci/mole C.E.A. (Saclay, France). La prostaglandine F2 $\alpha$  (5 mg/ml) a été offerte par le laboratoire

Tableau 1  
Action de la prostaglandine F<sub>2α</sub> et de l'HCG sur la synthèse de la progestérone dans le corps jaune cyclique humain.

		PROGESTERONE (μg/g)							
	CONCENT.	EXP. 15	EXP. 16	EXP. 17	EXP. 18	EXP. 20	EXP. 22	EXP. 24	EXP. 31
T <sub>0</sub>	—	53.6	16.3	—	20.4	TR.	50.4	59.6	TR
T <sub>inc.</sub>	—	78.7	38.4	49.5	25.3	30.4	116.9	75.8	40.6
PG F <sub>2α</sub>	2.5 μg/ml	—	40.7	48.8	—	24.5	—	120.3	—
PG F <sub>2α</sub>	5.0 -	—	45.7	77.8	—	—	—	—	—
PG F <sub>2α</sub>	7.5 -	—	65.3	60.3	40.5	67.1	146.2	169.5	—
PG F <sub>2α</sub>	10.0 -	—	—	60.0	45.3	—	151.5	—	108.9
PG F <sub>2α</sub>	12.5 -	—	—	71.4	—	58.0	—	—	—
PG F <sub>2α</sub>	15.0 -	—	—	51.1	—	—	—	—	100.8
PG F <sub>2α</sub>	20.0 -	25.3	—	—	—	—	—	—	—
PG F <sub>2α</sub>	80.0 -	40.1	—	—	—	—	—	—	—
PG F <sub>2α</sub>	320.0 -	46.5	—	—	—	—	—	—	—
HCG	20 U/ml	—	—	—	54.5	—	154.9	—	—
HCG	50 -	92.9	72.7	91.2	—	—	—	—	—
HCG	30 -	—	—	—	—	—	—	231.7	211.4

100 mg Environ de corps jaune par fiole d'incubation sont immergés dans 5 ml de milieu Krebs-Ringer, pH 7.2. Temps de pré-incubation 14 à 30 min. Temps d'incubation 3 hr.

Upjohn (Paris). La sérumbumine bovine (fraction V de Cohn) provient de chez Armour (USA). L'acide acétylsalicylique (aspirine) et les différents réactifs chimiques sont de provenance commerciale (Merck).

### 2.1. Incubation

Les corps jaunes utilisés dans ce travail sont obtenus au cours de laparotomies pratiquées en phase lutéale du cycle chez des malades exemptes de troubles endocriniens. L'âge du corps jaune est déterminé, à l'aide de la courbe de température et par des études histologiques de prélèvements d'endomètre obtenus pendant l'intervention.

Un seul corps jaune est utilisé par expérience. Il est morcelé et les fragments d'environ 10 mg sont répartis au hasard dans les fioles d'incubation contenant 5 ml

de milieu Krebs-Ringer glucosé, bicarbonaté et bicarbonaté et additionné de sérumbumine bovine (0,5%) (K.R.). En général, il ne s'écoule qu'une heure entre le prélèvement du tissu et le début de la pré-incubation. L'ensemble des conditions d'incubation, d'extraction et de dosage de la progestérone a été décrit précédemment (Hermier et Jutisz [15]).

## 3. Résultats

### 3.1. Action de la prostaglandine F<sub>2α</sub>

Comme le montre le tableau 1, nous avons étudié les effets de diverses concentrations de cette substance sur la synthèse de la progestérone dans des tissus incubés pendant 3 ou 4 heures. L'effet maximal

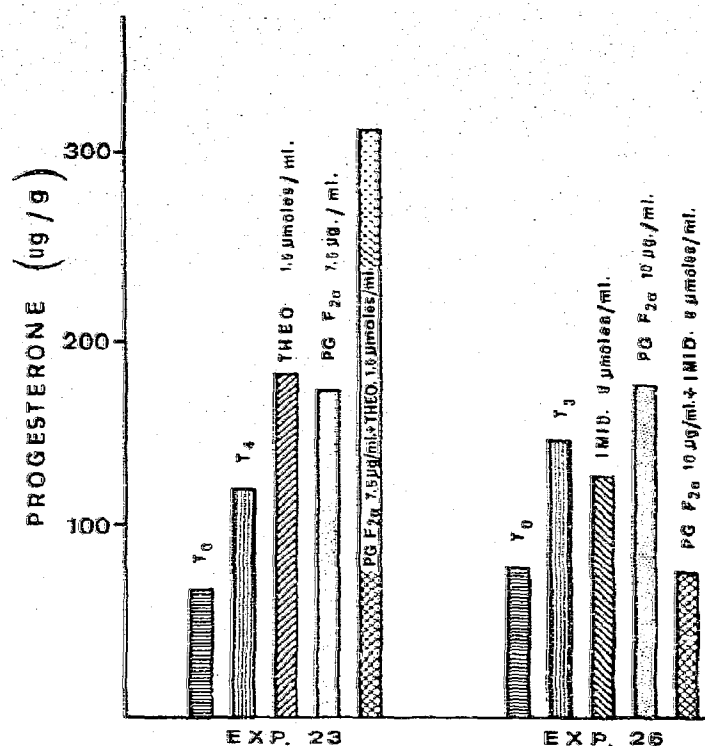


Fig. 1. Action de la théophylline et de l'imidazole sur la synthèse de la progestérone stimulée par la prostaglandine F<sub>2α</sub> (voir conditions tableau 1). Temps de pré-incubation 45 min en présence de la théophylline ou de l'imidazole.

est obtenu pour des concentrations de PG F<sub>2α</sub> comprises entre 7.5 et 12.5 μg/ml. Les doses supérieures ne donnent pas une stimulation plus importante et semblent même inhiber la stéroïdogénèse qui se produit dans les tissus témoins.

Il apparaît aussi, en comparant les quantités de progestérone synthétisées par gramme de corps jaune sous l'effet des quantités saturantes d'HCG et de PG F<sub>2α</sub> que l'hormone a toujours un effet supérieur à celui produit par la prostaglandine.

### 3.2. Rôle de l'cAMP dans la stéroïdogénèse

Pour mettre en évidence le rôle de l'cAMP comme intermédiaire de l'action de la prostaglandine dans la stéroïdogénèse, nous avons repris la méthode déjà utilisée pour l'HCG (Hermier et al. [8] 1972). La théophylline et l'imidazole agissant au niveau de la phosphodiesterase peuvent moduler directement l'action de l'cAMP (Butcher et Sutherland [16]) et indirectement celle des substances dont l'effet serait médié par le nucléotide. La théophylline inhibe la phosphodiesterase [16] et doit donc potentialiser

l'action des facteurs stimulants. L'imidazole active la phosphodiesterase [16] et permet ainsi de mettre en évidence un effet opposé.

La théophylline ajoutée dans le milieu avant la pré-incubation de 45 min et avant l'incubation à la concentration de 1.5 μmoles/ml potentialise l'action de la prostaglandine F<sub>2α</sub> (fig. 1, Exp. 23). L'introduction de l'imidazole dans les mêmes conditions expérimentales, à la concentration de 8 μmoles/ml, inhibe l'action stéroïdogénique de la prostaglandine F<sub>2α</sub> (10 μg/ml), (fig. 1, Exp. 26). Il nous semble donc que l'cAMP peut être considérée comme l'intermédiaire intracellulaire de cette action des prostaglandines.

### 3.3. Effet des concentrations maximales de gonadotrophine chorionique et de prostaglandine F<sub>2α</sub>

La possibilité d'une médiation intracellulaire identique des actions de l'hormone et de la prostaglandine par l'cAMP nous a amenés à étudier le comportement stéroïdogénique du corps jaune en présence de concentrations saturantes de ces deux substances. L'existence ou l'absence d'effets additifs dans ces condi-

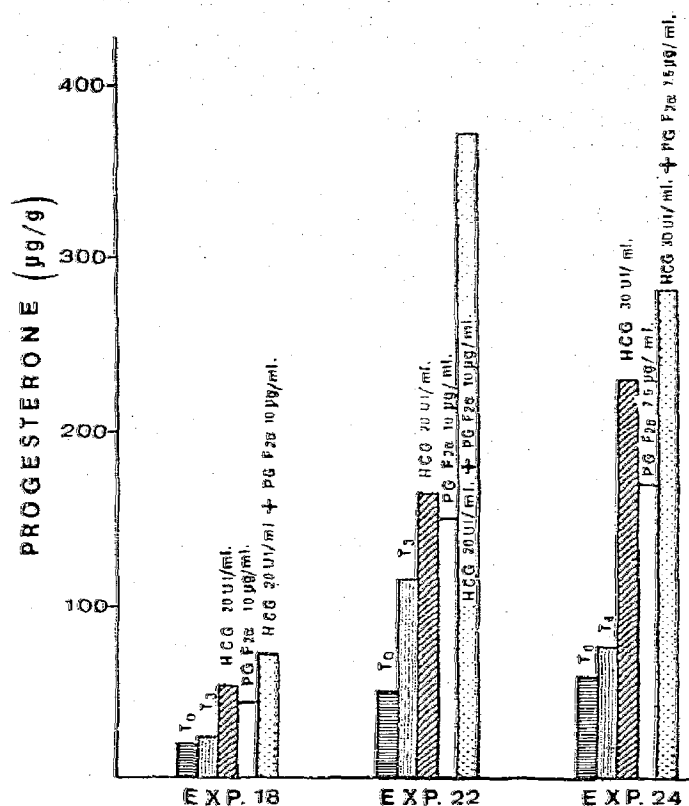


Fig. 2. Additivité de la synthèse de la progestérone pour les doses d'HCG et de PG F<sub>2α</sub> qui donnent une stimulation maximale de la stéroïdogénèse (voir conditions dans le tableau 1).

tions s'avère importante pour mieux comprendre leur mécanisme d'action sur l'adénylcyclase. Un effet additif est en effet en faveur de la présence des deux types de récepteurs, dans l'hypothèse où les prostaglandines ne sont pas les médiatrices indispensables entre le récepteur hormonal et l'adénylcyclase. Nos résultats expérimentaux (fig. 2) sont favorables à l'existence d'un effet additif de l'HCG (20–30 UI/ml) et de la prostaglandine F<sub>2α</sub> (7.5–12.5 µg/ml) sur la biosynthèse de la progestérone.

#### 3.4. Action de l'acide acétylsalicylique (aspirine)

L'hypothèse selon laquelle les prostaglandines sont des intermédiaires entre le récepteur membranaire de l'hormone et l'adénylcyclase (Kuehl et al. [13]) nous a conduit à étudier les effets des inhibiteurs de la biosynthèse des prostaglandines. Si cette hypothèse est exacte l'action de l'hormone devrait être abolie.

L'aspirine, substance inhibitrice de la biosynthèse

des prostaglandines *in vivo* (Collier [17]) et *in vitro* (Vane [18]) a été utilisée dans notre système à des concentrations variables (de 10<sup>-2</sup> M à 10<sup>-7</sup> M) pendant une pré-incubation (de 15 à 45 min) et en cours d'incubation en présence d'HCG (30 UI/ml). Les expériences effectuées dans ces conditions (4 au total) nous ont montré que l'acide acétylsalicylique n'avait aucune action sur la sécrétion de la progestérone stimulée par l'hormone.

#### 4. Discussion et conclusion

Dans le corps jaune humain, *in vitro*, nous avons montré que la prostaglandine F<sub>2α</sub> à des concentrations comprises entre 7.5 et 12.5 µg/ml est capable de stimuler la biosynthèse de la progestérone. Des doses supérieures à cette dernière ne sont pas plus actives et semblent même inhiber la synthèse qui se produit habituellement dans les tissus témoins.

Certains auteurs ont rapporté que *in vivo* la F2 $\alpha$  administrée à des singes en phase lutéale augmente le taux de progestérone plasmatique (Kirton et al. [9]) et que la perfusion de la même substance à petites doses dans l'artère ovarienne stimule la stéroïdogénèse, tandis que des doses plus fortes inhibent la sécrétion progestéronique ovarienne (Caldwell et al. [19]).

Ces observations faites *in vivo* sont opposées à celles décrites par Pharriss et Wyngarden [3] et Blatchley et Donovan [4] et McCracken [20] pour les mammifères inférieurs et à celles de Jones et Wentz [10] chez la femme où la prostaglandine F2 $\alpha$  avait été administrée en perfusion sans entraîner d'accroissement de la progestérone plasmatique. Il apparaît donc qu'en dehors des différences d'espèce, les problèmes de dose et de mode d'administration sont très importants. L'augmentation de la sécrétion de la progestérone sous l'effet des prostaglandines dans les corps jaunes *in vitro* semble dépendre d'un accroissement de l'cAMP intracellulaire consécutif à une activation de l'adénylcyclase, ainsi que l'ont montré Marsh [12] et Marsh et Lemaire [11]. Par une méthode différente de celle utilisée par ces auteurs nous apportons un nouvel argument en faveur du rôle de médiateur de l'cAMP dans ce mécanisme de stéroïdogénèse. La modulation de l'effet stéroïdogénique des prostaglandines par la théophylline et l'imidazole nous permet de penser que l'accroissement du nucléotide dépend plutôt d'une action au niveau de l'adénylcyclase que d'une action sur la phosphodiesterase. Dans ce dernier cas, en effet, il faudrait associer à l'action inhibitrice sur l'enzyme une production constante d'cAMP. Il semble donc que la prostaglandine F2 $\alpha$  et l'HCG exercent leur effet lutéotrope *in vitro* par des mécanismes qui se situent soit avant l'étape de l'activation de l'adénylcyclase soit sur cette étape même. L'effet lutéotrope additif de ces 2 substances plaide en faveur de l'existence de récepteurs membranaires distincts qui activeraient le système adénylcyclasique; cette dualité est admise par Kolena et Channing [21] et par Harbon et Clauser [22] pour des systèmes différents du nôtre. Au contraire les travaux de Kuehl [13] rendent plus vraisemblable l'hypothèse d'un récepteur hormonal spécifique et d'une médiation de son effet par les prostaglandines intramembranaires. Dans ces conditions, les prostaglandines exogènes pourraient jouer un rôle stéroïdogénique par simple augmentation de leur concentration intramembranaire (Franks

[23]). La synthèse d'une prostaglandine à partir d'acide [<sup>3</sup>H]arachidonique dans un homogénat d'ovaires de ratte gestante sous l'action de la LH, renforce cette hypothèse (Chasalow et Pharriss [24]). Dans le même sens Caldwell et al. [19] ont pu mettre en évidence une augmentation sensible de prostaglandine dans le sang de la veine ovarienne après injection intra artérielle d'HCG.

Les résultats que nous avons rapportés avec l'aspirine et ceux de Lamprecht et al. [25] qui n'ont pas réussi à obtenir avec l'indométhacine une inhibition de l'action de la LH sur l'ovaire de ratte, nous amènent à écarter l'hypothèse d'une médiation intramembranaire récepteur-adénylcyclase par les prostaglandines. D'autres expériences apparaissent cependant nécessaires pour confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses. Le mécanisme d'action hormonale proposé par Ramwell et Shaw [7] à partir de résultats obtenus dans différents systèmes paraît le mieux adapté au corps jaune. L'activation du récepteur spécifique entraînerait une stimulation directe de l'adénylcyclase membranaire mais en même temps exercerait un effet indirect sur la synthèse des prostaglandines intramembranaires. Ces dernières substances par des mécanismes inconnus (éventuellement par des transports ioniques transmembranaires suivant Ramwell et Shaw [7] et Labadie [26]) pourraient alors agir sur le système adénylcyclasique comme modulateur de l'action hormonale (Bergström [6], Bergström et al. [27]). Ce double mécanisme encore hypothétique permettrait d'expliquer un certain nombre de résultats apparemment contradictoires et d'envisager l'action des prostaglandines comme des modulateurs intramembranaires de l'action hormonale.

## Remerciements

Nous remercions le Professeur R. Musset et son service (Maternité de l'Hotel Dieu) pour le prélèvement des corps jaunes et Mlle Claudine Wisniewsky pour sa collaboration technique.

## References

- [1] Pharriss, B.B., Wyngarden, L.J. and Guiknecht, G.D. (1968) in: Gonadotropins (Rosenberg, E., ed.) p. 121, Geron X Inc., Los Altos.

- [2] Speroff, L. and Ramwell, P.W. (1970) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 30, 345.
- [3] Pharriss, B.B. and Wyngarden, L.J. (1969) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 130, 92.
- [4] Blatchley, F.R. and Donovan, B.T. (1969) *Nature* 221, 1065.
- [5] McCracken, J.A., Glew, M.E. and Scaramuzzi, R.J. (1970) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 30, 544.
- [6] Bergström S. (1967) *Science* 157, 382.
- [7] Ramwell, P.W. and Shaw, J.E. (1970) *Rec. Prog. Horm. Res.* 26, 139.
- [8] Hermier, C., Santos, A.A., Wisnewsky, C., Netter, A. and Jutisz, M. (1972) *Compt. Rend.* 275, 1415.
- [9] Kirton, K.T., Wyngarden, L.J. and Forbes, A.D. (1971) in: *Hormonal Steroids* (James, V.H.T. and Martini, L. eds) p. 685. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam.
- [10] Jones, G.S. and Wentz, A.C. (1972) *Am. J. Obstet. Gynecol.* 114, 393.
- [11] Marsh, J.M. and Lemaire, W.J. (1972) in: *Abstracts IV Int. Congress of Endocrinology, Washington 1972*, p. 182, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam.
- [12] Marsh, J.M. (1970) *FEBS Letters* 7, 283.
- [13] Kuehl, F.A., Humes, J.L., Tarnoff, J., Cirillo, V.J. and Ham, E.A. (1970) *Science* 169, 883.
- [14] Marsh, J.M. (1971) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180, 416.
- [15] Hermier, C. and Jutisz, M. (1968) *Compt. Rend.* 266, 242.
- [16] Butcher, R.W. and Sutherland, E.W. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 1244.
- [17] Collier, J.G. and Flower, R.J. (1971), *Lancet* 2, 852.
- [18] Vane, J.R. (1971) *Nature New. Biol.* 231, 232.
- [19] Caldwell, B.V., Auletta, F.J., Gordon, J.W. and Speroff, L. (1972) in: *Proceed. of the III Conference on Prostaglandins in Fertility Control*, Stockholm p. 217, W.H.O., Stockholm.
- [20] McCracken, J.A. (1972) in: *Proceed. of the III Conference on Prostaglandins in Fertility Control*, Stockholm, p. 234, W.H.O., Stockholm.
- [21] Kolena, J. and Channing, C.P. (1972) *Endocrinology* 90, 1543.
- [22] Harbon, S. and Clauser, H. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 1496.
- [23] Franks, D.J., McManus, J.P. and Whitfield, J.F. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 1177.
- [24] Chasalow, F.I. and Pharriss, B.B. (1972) *Prostaglandins* 1, 107.
- [25] Lamprecht, S.A., Zor, U., Tsafiriri, A. and Lindner, H.R. (1972) *Ist. J. Med. Sci.* 8.
- [26] Labaie, P. (1971) *Rev. Praticien* 24, 5004.
- [27] Bergström, S., Carlson, L.A. and Weeks, J.R. (1968) *Pharmacol. Rev.* 20, 1.