

Physiologie cellulaire

M. François MOREL, professeur

Le cours de physiologie cellulaire a porté, cette année, sur certains aspects d'un problème vaste et difficile : *le rôle biologique du calcium*. Les séminaires qui ont complété le cours étaient également consacrés à ce sujet. L'enseignement a comporté 10 cours et 8 séminaires.

Dans le premier cours, à titre d'introduction, les propriétés chimiques et physicochimiques du calcium ont été rappelées. La facilité avec laquelle le calcium ionisé forme des complexes et se chélate avec de très nombreux composés permet d'expliquer diverses propriétés biologiques de cet élément, en particulier son rôle régulateur dans de nombreuses fonctions cellulaires ; en effet, même à relativement basse concentration, l'ion calcium interagit avec de nombreuses macromolécules, et notamment des protéines enzymatiques dont il inhibe en général l'activité catalytique. D'ailleurs, la concentration du calcium ionisé dans les cellules est toujours maintenue très basse, beaucoup plus basse que celle du milieu extracellulaire ; bien que les parois cellulaires soient peu perméables aux ions calcium, l'inégale distribution de cet élément de part et d'autre ne correspond pas à un équilibre thermodynamique : on peut montrer que des processus de transport actif expulsent sans cesse hors de la cellule une quantité de calcium équivalente à celle qui pénètre par diffusion le long du gradient électrochimique.

La deuxième partie du cours a été consacrée à la discussion des mécanismes qui assurent, chez les mammifères, l'homéostasie calcique. Après avoir rappelé le rôle respectif de l'os, du tube digestif et du rein dans la balance calcique, les facteurs endocriniens qui assurent l'équilibre de cette balance interne et externe ont été analysés avec plus de détail. Les circonstances historiques qui, en 1961, conduisirent Copp à découvrir une nouvelle hormone, la calcitonine, ont été précisées, de même que les recherches qui, par la suite, permirent de montrer que cette hormone hypocalcémisante est

produite par les cellules parafolliculaires de la thyroïde. Dans les dernières années, l'origine embryologique ultimobranchiale des cellules sécrétant la calcitonine a été démontrée chez de nombreux vertébrés ; quant à la structure chimique de la calcitonine, elle a été établie récemment pour plusieurs espèces ; la calcitonine humaine, notamment, a été synthétisée. Il se sera donc écoulé moins de 10 ans entre la découverte et la synthèse de cette hormone polypeptidique contenant 32 résidus d'acides aminés.

Les modalités du contrôle respectif de la sécrétion de calcitonine et de parathormone par la teneur en calcium du sang qui irrigue la glande ont été ensuite discutées ; la fraction ionisée du calcium plasmatique — et jusqu'à un certain point celle du magnésium — semble un stimulus très spécifique ; lorsque cette fraction augmente, davantage de calcitonine est aussitôt excrétée, tandis que la libération de parathormone est inhibée ; l'effet du calcium sur le relargage de calcitonine pourrait impliquer l'activation d'une adénylcyclase membranaire et la production d'AMP cyclique.

Les effets respectifs, souvent inverses, de la parathormone et de la calcitonine sur les différentes composantes de la balance phosphocalcique ont été ensuite énumérés ; parmi ces effets, ceux pour lesquels le mécanisme d'action cellulaire de l'hormone a été étudié ont été analysés avec davantage de détail ; l'action de la parathormone sur le rein apparaît, à cet égard, un exemple privilégié. Sur le cortex de cet organe, l'hormone stimule spécifiquement une adényl-cyclase de localisation différente de celle qui est activée par la vasopressine. Il a été montré de plus que l'absence héréditaire des « récepteurs moléculaires » à l'hormone parathyroïdienne est responsable d'une maladie humaine, le pseudohypoparathyroïdisme, dans laquelle l'hormone est produite en quantité normale ; mais chez ces sujets, l'injection d'hormone exogène non seulement ne produit plus l'hypocalcémie et la phosphaturie habituelles, mais n'augmente plus l'excrétion urinaire d'AMP cyclique, ce qui traduit l'absence de réponse des récepteurs rénaux.

La troisième partie du cours a été consacrée à la discussion des mécanismes de transport cellulaire du calcium. L'absorption intestinale du calcium a été choisie comme modèle, en raison du nombre des travaux consacrés à son étude. Une discussion critique des données de la littérature a permis de dégager bon nombre d'hypothèses simplificatrices, pour ne pas dire erronées, qui sont le plus souvent implicitement introduites dans les études d'absorption intestinale conduites *in vivo* comme *in vitro*. En substance, les conclusions suivantes peuvent être déduites de cette analyse critique : l'absorption intestinale du calcium résulte certainement d'un processus de transport actif ; de plus, elle est stimulée par l'hormone parathyroïdienne. Chez l'animal carencé en vitamine D, l'absorption est considérablement réduite. L'administration de vitamine D pour restaurer les effets de la carence, doit être

effectuée un certain nombre d'heures avant l'expérience. Ce délai s'explique par deux ordres de faits : d'abord, la vitamine D₃, généralement utilisée, n'est pas le composé immédiatement actif sur la muqueuse intestinale. On sait aujourd'hui qu'elle doit être hydroxylée en position 25, probablement dans le foie, en 25 hydroxycholécalférol. Ensuite, le composé hydroxylé exerce son action sur la muqueuse intestinale en contrôlant au niveau nucléaire la synthèse de certaines protéines spécifiques impliquées dans le transport du calcium. L'une de ces protéines, très abondante dans la muqueuse digestive, a été isolée et caractérisée par Wasserman ; cette protéine possède la propriété de chélater réversiblement le calcium ionique avec une grande affinité. Il semble qu'elle soit localisée principalement dans la région apicale des cellules épithéliales du tube digestif. On en trouve également dans le rein. Dans les deux cas, sa synthèse est induite par la vitamine D. Mais le rôle exact de la protéine de Wasserman dans l'absorption intestinale du calcium n'est pas encore connu, pas plus, d'ailleurs, que ne le sont les mécanismes cellulaires qui président aux transferts du calcium à travers l'assise épithéliale. Il semble que la pénétration du calcium dans les cellules à travers leur membrane apicale puisse correspondre à un processus passif dont l'intensité est contrôlée par le degré de saturation des sites capables de chélater le calcium que comportent les protéines cellulaires. L'étape active du transport, dont le mécanisme est inconnu, se placerait dans la membrane basale des cellules. Pour préciser ces étapes encore conjecturales, il importerait de déterminer l'activité du calcium ionisé dans le milieu intracellulaire (ce qui n'a jamais été réalisé dans le cas des cellules épithéliales intestinales), et non se contenter de la simple mesure du calcium total.

Enfin, la quatrième partie du cours a été consacrée au rôle du calcium dans la contraction musculaire.

Les membranes du reticulum sarcoplasmique ont la propriété de pomper activement le calcium ionisé du sarcoplasme, et d'y maintenir sa concentration extrêmement basse. L'énergie nécessaire à cette accumulation est fournie par l'hydrolyse d'ATP. Lors de l'excitation, transmise au système sarcoplasmique par les tubules transverses, du calcium est relâché ; ce calcium diffuse jusqu'aux éléments contractiles voisins et les active en se fixant sur la troponine (le changement conformationnel qui en résulte permettrait l'interaction actine-myosine). C'est la recapture active du calcium par les vésicules du sarcoplasme qui, ensuite, constitue le facteur de relâchement dont le mécanisme d'action était resté si longtemps incompris. La discussion de ce problème nous a paru particulièrement enrichissante à divers points de vue. D'abord, parce que la compréhension du rôle central que joue le calcium dans le cycle de la contraction musculaire a permis de se forger enfin une représentation cohérente du couplage qui lie l'excitation et la contraction.

Ensuite, parce que ce problème particulier met en évidence de manière très nette le rôle régulateur central que l'ion calcium joue dans certaines fonctions cellulaires ; il est probable que le calcium apparaîtra tout aussi fondamental dans bien d'autres systèmes. Enfin parce que cette belle page de biologie moderne a pu être écrite grâce au concours de spécialistes relevant de disciplines biologiques diverses : microscopistes électroniciens, biochimistes, électrophysiologistes, physico-chimistes.

SÉMINAIRES

M. F. MOREL : *Dernières acquisitions concernant le mode de production et d'action de l'AMP cyclique.*

M. MONGIN, chargé de recherches à l'INRA : *Rôle de l'équilibre acido-basique dans le mécanisme de calcification de la coquille de l'œuf d'oiseau.*

M. ISTIN, ingénieur au C.E.A. : *Etude de la perméabilité calcique du manteau des lamellibranches.*

M. le D^r SACHS, Faculté de Médecine de Paris : *Les fractions physico-chimiques du calcium plasmatique et leur mesure.*

M. GARY-BOBO, sous-directeur de laboratoire au Collège de France : *Action du calcium sur la perméabilité des membranes naturelles et artificielles.*

M. BORDIER, maître de recherches à l'INSERM : *Etude cytologique de la calcification du tissu osseux.*

M. MILHAUD, professeur à la Faculté de Médecine de Paris : *La régulation endocrinienne de la balance phospho-calcique.*

M. SCHATZMANN, professeur à l'Ecole vétérinaire de Berne : *Le transport du calcium par la paroi du globule rouge humain.*

ORGANISATION DU LABORATOIRE ET ACTIVITES DE RECHERCHE

Le laboratoire de Physiologie cellulaire a continué d'héberger, durant l'année écoulée, les équipes mises en place par M. Robert COURRIER ; leur activité de recherche est analysée ci-dessous sous la rubrique *endocrinologie*. Quant aux recherches effectuées sous la responsabilité scientifique de M. François MOREL, elles se sont poursuivies pour partie à Saclay dans le cadre du Département de Biologie du CEA (Physiologie rénale), et pour partie au

Collège de France. L'orientation des recherches effectuées au Collège de France est résumée ci-dessous sous la rubrique *Physiologie cellulaire*.

Physiologie cellulaire

Le thème général des recherches actuellement poursuivies porte sur l'analyse des mécanismes et de la régulation des propriétés de perméabilité et de transport ionique des cellules épithéliales. Ce thème est abordé dans trois directions différentes : physico-chimique, physiologique et biochimique.

Les études physico-chimiques ont porté sur l'analyse de la diffusion de l'eau et des non-electrolytes dans les gels mesomorphes phospholipides-eau, envisagés comme modèles de structure des membranes biologiques. D'autre part, l'influence du calcium sur les propriétés de perméabilité de membranes artificielles de phospholipides d'une part, de membranes cellulaires (vessie de grenouille) d'autre part, a été entreprise.

Les études physiologiques ont porté sur la régulation hormonale du transport actif de sodium par la peau des amphibiens. Une préparation d'épithélium isolé a été mise au point, qui conserve les propriétés de la structure complète. Sur cette préparation, l'analyse des effets produits par les catécholamines a permis de démontrer la présence de deux types de récepteurs : des récepteurs β , qui stimulent le transport de sodium en activant une adénylcyclase membranaire, et des récepteurs α , possédant un effet inhibiteur par un mécanisme inverse.

Grâce à la synthèse d'ocytocine tritiée de haute activité spécifique réalisée en collaboration avec l'équipe de M. FROMAGEOT à Saclay, l'étude des « récepteurs » de cette hormone dans les cellules épithéliales des amphibiens a pu être entreprise. Des résultats encourageants ont été obtenus sur l'épithélium isolé de la peau de grenouille ; sur cette préparation, en effet, une interaction de l'hormone marquée avec la structure a pu être observée, dont les modalités (cinétique en fonction du temps et de la concentration, déplacement par les seuls analogues de structure biologiquement actifs) satisfont les critères que l'on attend de récepteurs impliqués dans le déclenchement de l'action hormonale.

Les études biochimiques ont porté sur un programme complémentaire des études précédentes. La présence de deux fractions ATPasiques Na-K dépendantes dans la vessie et la peau des amphibiens a été confirmée, de même que l'activation de l'une d'entre elle par l'AMP cyclique. De plus, une kinase activée par l'AMP cyclique ($K_m 10^{-6}M$) et phosphorylant les histones, a été mise en évidence dans les cellules épithéliales de la vessie de grenouille. Deux fractions phosphodiéstrasiques différant entre autres par leur thermosensi-

bilité et par leur affinité pour l'AMP cyclique, ont pu être caractérisées dans les cellules de la vessie de la grenouille et du rein du rat. Enfin, les variations de la concentration de l'AMP cyclique, soit dans l'urine (chez le rat), soit dans certains tissus (peau et vessie des amphibiens), sont analysées en réponse à l'action de diverses hormones.

Endocrinologie

M. M. JUTISZ a poursuivi, avec ses collaborateurs, des recherches dans les trois directions suivantes : a) la purification et l'étude physico-chimique de LH de plusieurs espèces a permis de montrer le polymorphisme moléculaire des sous-unités de cette hormone ; b) la mise au point du dosage radioimmunologique de la LH de rat et de la FSH de mouton a été achevée, et la méthode adaptée au dosage des gonadotrophines plasmatiques du rat ; c) des études physiologiques sur le rôle de l'AMP cyclique dans le mécanisme d'action de ces hormones ont permis de préciser qu'une synthèse protéique n'est pas impliquée dans le cas de la libération de LH par LRF, alors qu'au contraire, la synthèse d'une protéine à renouvellement rapide intervient dans la stéroïdogénèse (progestérone) induite par LH dans le corps jaune.

M^{11°} ACKER et ses collaboratrices ont poursuivi leurs recherches sur le déterminisme de l'ovulation et la physiologie du corps jaune chez la Ratte.

M. ASCHHEIM, de son côté, a fait progresser son analyse du fonctionnement de l'ovaire de la ratte sénile et de son contrôle endocrinien par l'hypophyse et l'hypothalamus.

PROMOTIONS ET DIPLOMES

M^{11°} Françoise BASTIDE et M. Claude COMTE ont soutenu leur thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences ; M^{11°} Paloma de la LLOSA a soutenu une thèse d'université ; M^{m°} M. BAILLY du BOIS a obtenu un diplôme de DEA, ainsi que M^{11°} ARIAS.

MISSIONS ET CONGRÈS

M. MOREL a participé au 4^e Congrès international de Néphrologie à Stockholm, à un colloque sur l'AMP cyclique organisé à Washington par la Fogarty Foundation, et, en compagnie de M. GARY-BOBO et de M. JARD, au Congrès international de Biophysique de Boston. Il a fait partie d'une

mission de « génie biologique et médical » qui s'est rendue en Israël en septembre 1969. M. CEHOVIC a effectué une mission de longue durée aux U.S.A., où il a travaillé dans plusieurs laboratoires d'endocrinologie ; M. JARD a effectué une mission d'étude de trois semaines aux U.S.A., où, de son côté, M. GARY-BOBO a travaillé pendant l'été dernier au Biophysical Laboratory, Harvard Medical School. En outre, M. GARY-BOBO a suivi le cours sur les biomembranes organisé à l'Institut Weizmann. M^{lle} IMBERT et M. BOCKAERT ont participé à la réunion des physiologistes de langue française de Lausanne. M. JUTISZ et M^{lle} THEOLEYRE ont présenté une communication au cours d'une « Table Ronde » sur la Chimie des Gonadotropines, à Birmingham ; M. JUTISZ, M^{lle} Paloma de la LLOSA, M^{me} BERAULT et M. KERDELHUE ont présenté un rapport au Colloque national de Neuroendocrinologie organisé par le C.N.R.S. ; M. JUTISZ a présenté un rapport au Symposium de la Deutsche Neurovegetative Gesellschaft sur la régulation de la fonction sexuelle par le système nerveux central, à Göttingen ; M. JUTISZ a été invité en novembre 1969 par l'Institut de Recherches cliniques de Montréal comme conférencier de la Fondation Pfizer ; M. JUTISZ a également présenté un rapport au cours d'une « Table Ronde » sur le Testicule humain qui s'est tenue à Positano (Italie). M. ASCHHEIM a présenté un rapport au 2^e Colloque français de Neuro-endocrinologie à Paris, en septembre 1969 ; il a également participé au Colloque sur la fonction hypophysaire des animaux sauvages (Chizé, octobre 1969).

PUBLICATIONS

1) *Physiologie rénale*

C. LECHENE, F. MOREL, M. GUINNEBAULT et C. de ROUFFIGNAC, *Etude par microponction de l'élaboration de l'urine. I. Chez le Rat dans différents états de diurèse (Néphron, 6, p. 457-477, 1969).*

F. MOREL, C. de ROUFFIGNAC, D. MARSH, M. GUINNEBAULT et C. LECHENE, *Etude par microponction de l'élaboration de l'urine. II. Chez le Psammomys non diurétique (Néphron, 6, p. 553-570, 1969).*

C. de ROUFFIGNAC, C. LECHENE, M. GUINNEBAULT et F. MOREL, *Etude par microponction de l'élaboration de l'urine. III. Chez le Mérion non diurétique et en diurèse par le mannitol (Néphron, 6, p. 643-666, 1969).*

C. de ROUFFIGNAC, J. STEWART et F. MOREL, *Etude par microponction de l'élaboration de l'urine. IV. Chez la Souris en diurèse saline (Néphron, sous presse).*

F. MOREL et C. de ROUFFIGNAC, *Microperfusion study of urea medullary recycling in desert rodents (Excerpta Medica, Urea and the Kidney, Proc. of Intern. Col. Sarasota, Florida, septembre 1968, p. 401-413, Bodil Schmidt-Nielsen, Ed. 1970).*

F. MOREL, N. ROINEL et C. LE GRIMELLEC, *Electron probe analysis of tubular fluid composition (Néphron, 6, p. 350-364, 1969).*

F. MOREL et N. ROINEL, *Application de la microsonde électronique à l'analyse élémentaire quantitative d'échantillons liquides d'un volume inférieur à 10^{-9} l (Journal de Chimie Physique, 66, n° 6, p. 1084-1091, 1969).*

F. MOREL, *Permeability properties of the thin descending limb of the loop of Henle (IVth Congr. Intern. Nephrol Stockholm, juin 1969, Abstracts Gen. Ses. Symp., p. 72).*

F. MOREL, Y. MURAYAMA and C. de ROUFFIGNAC, *Microperfusion experiments of loops of Henle in a desert rodent species (IVth Congr. Intern. Nephrol, Stockholm, juin 1969, Abstracts 1, p. 237).*

A.D. BAINES and F. MOREL, *Absorption of acidic amino acids from proximal tubule fluid (IVth Congr. Intern. Nephrol, Stockholm, juin 1969, Abstracts 1, p. 293).*

2) Physiologie cellulaire

J.L. MORGAT, LAM THANH HUNG, R. CARDINAUD, P. FROMAGEOT, J. BOCKAERT, M. IMBERT et F. MOREL, *Peptidic hormone interactions at the molecular level-preparation of highly labelled ^3H oxytocin (Journal of Labelled Compounds, sous presse).*

F. MOREL, *L'Adénosine monophosphate cyclique, médiateur intracellulaire de l'action de nombreuses hormones (Triangle, 9, n° 4, 1969).*

S. JARD, R. RAJERISON et M. MONTEGUT, *Inhibition des effets de l'ocytocine sur la peau et la vessie de grenouille par l' (2-0 Ethyltyrosine-ocytocine) (Biochim. Biophys. Acta, 196, 1970, p. 85-94).*

S. JARD and F. BASTIDE, *A cyclic AMP-dependent protein kinase from frog bladder epithelial cells (Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, p. 559-566, 1970).*

S. JARD, J. BOURGUET, P. FAVARD and N. CARASSO, *The role of intercellular channels in the transepithelial transfer of water and sodium in the frog urinary bladder [J. Membrane Biol. (sous presse)].*

J. BOCKAERT, S. JARD and F. MOREL, *Fixation d'ocytocine tritiée sur les cellules épithéliales de la peau de grenouille (Communication à l'Association des Physiologistes, Lausanne, décembre 1969).*

M. IMBERT, S. JARD et F. MOREL, *Evolution dans le temps de la concentration plasmatique et de l'excrétion rénale de radioactivité après injection intraveineuse d'ocytocine tritiée chez le Rat (Communication à l'Association des Physiologistes, Lausanne, décembre 1969).*

S. JARD et F. MOREL, *Structure, activité et mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires (Colloques internationaux du C.N.R.S., n° 177, La spécificité zoologique des hormones hypophysaires et de leurs activités, Paris, 16-20 juillet 1968, p. 79-88).*

Cl. GARY-BOBO, *Role of hydrogen bonding in non electrolyte diffusion through dense artificial membranes (J. Gen. Physiol., 54, p. 369, 1969).*

Cl. GARY-BOBO, *Permeability coefficients in human red cells and non porous artificial membranes (Third International Congress of the IUPAB, Cambridge Mass., août 1969).*

3) Endocrinologie

M. JUTISZ, *Quelques considérations sur le mécanisme d'action des hormones hypothalamiques qui contrôlent la sécrétion gonadotrope hypophysaire (Hommage à Jacques Benoit) (Arch. Anat. Histol. Embr. Norm. Exp., 1968, 51, p. 365-370).*

P. de la LLOSA and M. JUTISZ, *Reversible dissociation into subunits and biological activity of ovine luteinizing hormone (Biochim. Biophys. Acta, 1969, 181, p. 426-436).*

P. de la LLOSA, *Gonadotropins, Proceedings of the International Symposium, Liège, May 19-25, 1968 (Excerpta Medica I.C.S., no. 161, Protein and Polypeptide Hormones, 1969, Part 3, Discussions, p. 798-799).*

M. JUTISZ, *Gonadotropins, Proceedings of the International Symposium, Liège, May 1968 (Excerpta Medica I.C.S., no. 161, Protein and Polypeptide Hormones, 1969, Part 3, Discussions, p. 800-801).*

M. JUTISZ, *Données récentes sur le mode d'action des hormones hypothalamiques FRF et LRF (FSH - et LH- releasing factors) [Acta Neurol, Belg. 1969, 69, p. 491-500].*

M. JUTISZ et P. de la LLOSA, *La spécificité chimique et immunologique des hormones gonadotropes (Colloques internationaux du C.N.R.S., n° 177 : La spécificité zoologique des hormones hypophysaires et de leurs activités, Paris, 16-20 juillet 1968, p. 293-314).*

C. HERMIER et M. JUTISZ, *Biosynthèse de la progestérone in vitro dans le corps jaune de la ratte pseudo-gestante : influence du Ca^{2+} et du Mg^{2+} sur les effets stimulants dus à l'hormone lutéinisante, à l'adénosine -3', 5' monophosphate cyclique ou à un accroissement de la concentration en potassium* (Biochim. Biophys. Acta, 1969, 192, p. 96-105).

B. KERDELHUE, A. BERAULT, C. COURTE et M. JUTISZ, *Mise au point d'un dosage radioimmunologique de l'hormone lutéinisante (LH) de Rat au moyen d'un immunosérum anti-LH de Mouton et d'une préparation marquée de LH de Rat* (C.R. Acad. Sc., 1969, Série D., 269, p. 2413-2416).

M. JUTISZ, *A propos de la régulation de la sécrétion gonadotrope hypophysaire* (In « *Ovo-Implantation-Human gonadotropins and Prolactin* », Proceedings of the 2nd Intern. Seminar on Reproductive Physiology and Sexual Endocrinology, Brussels, 1968, Karger, Bâle, 1970, p. 195-201).

G. ACKER and J.J. ALLOITEAU, *Hypophysectomie au début du cycle oestral de la Ratte : rétablissement de l'oestrus vaginal et de l'aptitude à l'ovulation par les gonadotropines hypophysaires* (C.R. Acad. Sc., t. 268, p. 2934, 16 juin 1969).

G. ACKER et J.J. ALLOITEAU, *Le corps jaune peut-il s'opposer à l'ovulation lorsque la progestérone en est incapable ?* (C.R. Acad. Sc., t. 269, p. 2874, 12 novembre 1969).

G. ACKER et D. CHABARDES, *Pseudogestation par injection d'une dose minime de benzoate d'oestradiol chez la Ratte* (C.R. Soc. Biol., 13 janvier 1970).

G. ACKER et J.J. ALLOITEAU, *L'hormone lutéinisante peut-elle exercer une action antiovulatoire chez la Ratte ?* (C.R. Acad. Sc., 1^{er} avril 1970).

P. ASCHHEIM, *La rétroaction ovarienne dans la régulation hypothalamique de la fonction gonadotrope LH de la Ratte sénile* (2^e Colloque français de Neuro-Endocrinologie, Editions du C.N.R.S., 1970).