

## **Physiologie cellulaire**

M. François MOREL, professeur

Le cours de Physiologie cellulaire, en cette année 1974-1975, a porté sur les aspects moléculaires des propriétés de perméabilité et de transport des membranes biologiques.

En exergue à l'étude de ce sujet actuel mais difficile, et à titre de propos liminaire, il a d'abord été constaté que nos connaissances actuelles touchant l'organisation des membranes et plus encore la nature des protéines fonctionnelles qu'elles incluent, leur conformation ou leur structure, que nos connaissances sur ces matières apparaissent encore singulièrement rudimentaires, surtout lorsqu'on les compare à celles, très avancées, qui intéressent par exemple les protéines enzymatiques solubles. Ce retard relatif, que l'on pourrait chiffrer à environ deux décennies s'il fallait en évaluer l'importance, résulte de deux difficultés inhérentes aux membranes dont on ne saurait surestimer l'influence ; la première tient à l'hydrophobicité de la phase lipidique membranaire ; la seconde tient à la nature même des processus de transport membranaire.

1) Les protéines membranaires impliquées dans les mécanismes de diffusion facilitée ou de transport de substrat sont nécessairement profondément ancrées dans la phase phospholipidique — ou tout au moins incluses de façon stable à l'interface lipide-eau, ce qui implique qu'une portion importante de leur surface externe porte des radicaux hydrophobes. C'est dire que ces protéines, dans leur conformation physiologique, ne sont pas solubles dans l'eau, et par conséquent que leur étude n'est pas justiciable des méthodes conventionnelles de la biochimie des protéines hydrosolubles. Des méthodes nouvelles voient progressivement jour, qui sont mieux adaptées aux protéines membranaires. Signalons cependant que les principales difficultés ne sont pas toutes surmontées, de sorte qu'aucune protéine membranaire n'a encore jusqu'ici pu être analysée jusqu'à connaître, par exemple, sa structure primaire.

2) La nature des fonctions physiologiques remplies par ces protéines contribue, de son côté, à rendre leur caractérisation singulièrement difficile. En effet, s'agissant de perméation sélective, les protéines en question possèdent, vis-à-vis de leur substrat, des sites de reconnaissance spécifiques qui les apparentent aux protéines enzymatiques. Mais, à la différence de ces dernières qui possèdent une activité catalytique, mesurable en phase homogène après purification de la protéine, les protéines de transport assurent la *translocation* du substrat à travers la membrane ; il s'agit d'une fonction vectorialisée dans laquelle la structure du ligand reste inchangée ; la fonction n'existe et ne peut être reconnue que si la compartimentalisation naturelle du système biologique est respectée. Comme tous les processus vectoriels, les processus de transport ne sont pas la résultante de propriétés moléculaires, comme le sont les réactions catalysées par des enzymes par exemple, mais l'expression de propriétés de systèmes organisés. Dissocier le système en ses parties pour les étudier séparément revient à détruire la fonction ; d'où la nécessité de tenter a posteriori des reconstructions. Deux exemples suffiront à mettre en lumière cette limitation fondamentale. Celui des ATPases liées aux processus de transport actif d'ions sodium et potassium. Malgré les difficultés inhérentes à l'étude des protéines hydrophobes, on sait aujourd'hui beaucoup sur l'énergisation du transport, c'est-à-dire sur les conditions dans lesquelles — et sur les sites moléculaires sur lesquels — la phosphorylation réversible de la protéine se produit ; par contre les mécanismes conduisant à la translocation des ions à travers la membrane sont encore parfaitement inconnus, même si les hypothèses sont nombreuses. Autre exemple : la perméabilisation par l'acetyl-choline de la membrane post-synaptique ou post-jonctionnelle. La protéine réceptrice du médiateur a été reconnue, solubilisée, caractérisée, et sa structure est près d'être établie ; et pourtant, la conséquence de l'interaction de l'acetylcholine avec son récepteur, c'est-à-dire la perméabilisation de la membrane pour le sodium, est encore mal comprise comme est mal défini « l'ionophore » en tant qu'entité chimique.

\*

\*\*

L'étude des membranes à l'échelle moléculaire doit être précédée d'une analyse minutieuse de ses propriétés physiologiques principales. Or, nous l'avons vu, cette étude ne peut être conduite que sur le système membranaire complet, dans sa compartimentalisation naturelle ; selon la complexité du système utilisé, le nombre des paramètres impliqués risque d'être grand, et par conséquent les informations recueillies plus phénoménologiques que mécanistiques. Les approches théoriques et expérimentales les plus appropriées à ce type de situation ont été rappelées dans leur principe. On a souligné les ressources et les limitations de la méthode des indicateurs pour la mesure

des flux unidirectionnels transmembranaires en état stationnaire ; on a rappelé également que les systèmes biologiques vivants ont la propriété de maintenir un état stationnaire très différent de l'équilibre thermodynamique, et que, par conséquent, le formalisme de la thermodynamique des processus irréversibles est le seul qui soit approprié ; malheureusement, lorsque le nombre des forces et des flux nets de matière intervenant dans le système étudié est grand, les coefficients phénoménologiques croisés sont trop nombreux pour que ce formalisme moderne et adapté ait permis, dans la pratique, des progrès significatifs dans la connaissance des propriétés des membranes.

\*  
\*\*

Plusieurs leçons, ensuite, ont été consacrées à discuter longuement le processus de perméation membranaire dit de « diffusion facilitée ». La saturabilité du flux en fonction de la concentration du substrat, la spécificité du système de transports vis-à-vis de la structure du substrat, la possibilité de réaliser des inhibitions par compétition, autant de propriétés qui suggèrent des analogies étroites entre la première étape du transport par diffusion facilitée, et la première étape d'une réaction enzymatique : la présence sur la protéine impliquée d'un site de liaison de conformation spécifique et appropriée. On comprend dès lors que de nombreux chercheurs aient appliqué les méthodes de la cinétique enzymatique à l'étude des systèmes les plus divers de diffusion facilitée. Les résultats obtenus sont tout à la fois encourageants et décevants. Encourageants, car ils ont permis, indirectement, de définir de nombreuses propriétés des systèmes de transport touchant : la conformation — ou plutôt la stéréospécificité — requise pour l'interaction transporteur-substrat ; la stœchiométrie des cotransports et contre-transports ; l'affinité des liaisons spécifiques correspondantes, etc. Décevants, car les analyses cinétiques de ce type ne procurent aucune information, même indirecte, sur les mécanismes moléculaires qui assurent la translocation du substrat à travers la membrane (transporteurs mobiles, pores hydrophiles, oscillateurs moléculaires, transconformations propagées, etc.).

\*  
\*\*

A propos d'un exemple expérimental étudié au laboratoire et discuté au cours, des critiques plus fondamentales ont été envisagées, qui concernent l'étude des processus de transports membranaires par des méthodes cinétiques tirées de l'enzymologie. L'exemple en question est celui de la perméabilité aux ions sodium de la face apicale des cellules épithéliales de la peau des amphibiens. On sait que cette assise cellulaire met en contact le « milieu intérieur » de l'animal avec son environnement ; c'est à travers elle que s'ef-

fectuent les échanges hydrominéreaux principaux de l'organisme et la régulation de sa balance osmotique. Les propriétés de cette structure peuvent être analysées *in vitro* ; en simplifiant, les assises épithéliales de la peau peuvent être assimilées à deux membranes en série, l'une, la membrane « basale », séparant milieu intracellulaire et milieu intérieur, l'autre la membrane « apicale », séparant milieu intracellulaire et milieu externe. Ces deux membranes possèdent des propriétés de perméabilité et de transport différentes : celles de la membrane basale rappellent les propriétés habituelles des autres cellules de l'organisme ; au contraire la membrane apicale possède des propriétés remarquables notamment vis-à-vis des cations alcalins : elle est virtuellement imperméable au potassium et hautement perméable au sodium. L'inverse s'applique à la membrane basale qui, de plus, est le siège d'un processus de transport actif de  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  lié à une ATPase. Des conditions expérimentales particulières nous ont permis, en collaboration avec Gérard Leblanc, d'analyser *in vitro* de façon simple et précise les modalités de perméation des ions sodium à travers la face apicale de cette structure. Ces conditions consistent à bloquer le transport actif basal par l'ouabaine et à dépolariser la membrane basale en utilisant comme milieu interne une solution où l'ion  $\text{Na}^+$  est remplacé par l'ion  $\text{K}^+$ . En outre, la préparation est « court-circuitée » par un circuit externe équivalent à un shunt de résistance nulle. Le courant électrique qui traverse la peau (et le circuit externe) est enregistré ; il a pour facteur limitant la perméabilité de la membrane externe pour les ions sodium, et son intensité mesure à chaque instant le flux net de sodium qui traverse la membrane apicale, comme l'ont prouvé diverses vérifications qu'il serait trop long de développer ici. L'association de mesures de flux transmembranaires par des méthodes électriques et isotopiques a permis de préciser certaines modalités des transferts de sodium qui paraissent difficilement compatibles avec les équations cinétiques habituellement utilisées : ainsi, par exemple, le flux net initial de sodium augmente-t-il en fonction de la concentration de sodium introduite dans le milieu externe selon une courbe non linéaire de saturation parfaitement décrite par l'équation de Michaelis-Menton, et pourtant, en fonction du temps après l'addition de sodium, l'intensité du courant décroît de façon strictement exponentielle, suggérant un flux net proportionnel à la différence de concentration existant à travers la membrane. De même, l'asymétrie observée dans les paramètres du système (reversibilité des flux, importance du phénomène de transinhibition) n'est pas compatible avec les modèles cinétiques habituels. L'origine de ces discordances est probablement à rechercher dans les hypothèses simplificatrices que comporte le traitement cinétique tel qu'il est toujours envisagé ; on admet par exemple que la vitesse de formation du complexe,  $V_1$ , est proportionnelle au produit des concentrations du ligand et de l'accepteur libre ; mais peut-on parler de concentration (moles/litre) s'agissant d'un constituant membranaire

interagissant avec un substrat de la phase aqueuse dans un système hétérogène et structuré ? On admet aussi que l'équilibre de liaison est instantané par rapport à la probabilité de translocation, ce qui permet de poser que cette dernière agit comme seul facteur limitant la vitesse du processus mesuré. Mais cette hypothèse n'est nullement assurée, ni même justifiée.

\*  
\*\*

Un dernier chapitre du cours, enfin, a été consacré à la discussion de la signification physiologique des processus de diffusion facilitée. On a insisté tout particulièrement sur l'importance fondamentale que pouvait comporter, dans la régulation des flux transmembranaires, l'existence de systèmes transporteurs comportant plusieurs sites indépendants capables de lier des substrats différents ; par des processus de contre-transport ou de co-transport couplés, de tels systèmes peuvent en effet effectuer pour certains ligands (pour exemples des sucres ou des acides aminés) des transports nets *contre* un gradient chimique transmembranaire, s'il existe par ailleurs dans le système une différence de potentiel électrochimique pour un autre ligand du même système de transport. C'est ainsi qu'il est aujourd'hui bien établi que, dans de nombreux types cellulaires, l'accumulation apparemment active de divers sucres ou acides aminés est en réalité le résultat d'un processus de diffusion facilitée purement passif, mais couplé à la diffusion facilitée d'ions sodium le long de leur gradient électro-chimique. Ainsi, le processus de transport *actif* de sodium lié à l'hydrolyse d'ATP permettrait-il, par l'intermédiaire de l'asymétrie de distribution des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  qu'il provoque entre milieux intra et extra cellulaires, permettrait-il par couplages secondaires d'énergiser l'accumulation de nombreux substrats organiques nécessaires au métabolisme.

On voit donc que si les mécanismes moléculaires qui président aux échanges membranaires par diffusion facilitée sont encore mal compris, leur rôle physiologique est aujourd'hui reconnu et apparaît de plus en plus important et général.

#### SÉMINAIRES

M. Claude GARY-BOBO, professeur à l'Université de Paris VI, *Interactions protéines-lipides et modèles d'organisation moléculaire des membranes.*

M. Claude GARY-BOBO, professeur à l'Université de Paris VI, *Mécanisme d'action perméabilisante des antibiotiques macrocycliques.*

M. Claude BERGMANN, maître de conférence à l'Université de Paris VII, *Les canaux à sodium de la membrane nerveuse ; fonctionnement possible à l'échelle moléculaire.*

M. SCHECHTER, maître de conférence à l'Université de Paris XI (Orsay), *Etudes des transports membranaires par des méthodes de fluorescence.*

M. Philippe DEVAUX, maître de conférence à l'Université de Paris VII, *Etude par RPE des protéines membranaires.*

M. Philippe CHAMPEIL, boursier Grandes Ecoles, *L'ATPase du reticulum sarcoplasmique, problèmes liés à la translocation du calcium.*

M. René MOTAIS, professeur à la Faculté des Sciences de Nice, *Perméabilité anionique des globules rouges. Stéréospécificité des substrats.*

M. René MOTAIS, professeur à l'Université de Nice, *Perméabilité anionique des globules rouges. Effet direct des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique.*

M. Luchio BENEDETTI, directeur de recherche, C.N.R.S., *Etude ultrastructurale de l'organisation des membranes biologiques.*

#### TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Nous résumerons, dans une première partie, les recherches poursuivies durant l'année écoulée dans les principaux groupes qui forment le laboratoire de Physiologie cellulaire puis, dans une deuxième partie, nous indiquerons celles effectuées par les équipes rattachées à la chaire de Physiologie cellulaire.

##### I) *Etudes de Physiologie cellulaire*

Elles ont porté principalement sur trois types de problèmes.

a) Au Collège de France, comme cela a déjà été mentionné l'année dernière, un programme de recherche a été mis en route en vue de déterminer expérimentalement la distribution précise, le long des néphrons du lapin, des segments qui répondent à l'action des principales hormones peptidiques qui contrôlent les fonctions du Rein. Ce programme expérimental repose sur l'analyse suivante : on sait que beaucoup d'hormones (AVP, PTH, catécho-

lamines, calcitonine, etc.) exercent leurs effets via la production intracellulaire d'AMP cyclique dans les cellules cibles. Une stimulation de l'acidité adénylate cyclasique par ces hormones peut d'ailleurs être obtenue sur des homogénats de tissu rénal, mais les quantités de protéines tissulaires utilisées pour le dosage enzymatique sont habituellement de l'ordre de 50 à 100  $\mu\text{g}$  dans 50 à 100  $\mu\text{l}$ . Si la sensibilité du dosage pouvait être augmenté de 1 000 fois, il deviendrait possible de mesurer l'activité enzymatique d'échantillons contenant 0.05 à 0.1  $\mu\text{g}$  de protéines membranaires, c'est-à-dire correspondant à un seul fragment tubulaire mesurant environ 0.5 mm de longueur. Or, après traitement du rein de lapin par la collagénase, il est possible, par microdissection, de reconnaître et d'isoler la plupart des segments que comporte le néphron. Une microtechnique de dosage de l'activité adénylate cyclasique a donc été mise au point, qui comporte la sensibilité requise. Le volume final d'incubation a été ramené à 2.5  $\mu\text{l}$ ; l'ATP  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ , précurseur du cAMP, est employé sans dilution isotopique par de l'ATP froid.

Avec cette technique, les activités de base et stimulées par le Fluorure ont été mesurées dans 12 segments différents des néphrons. Tous les segments étudiés contenaient l'enzyme. La teneur maximale (par mm de longueur tubulaire) a été observée dans les segments distaux des tubules. La réponse de l'enzyme de ces fragments à la parathormone (PTH de bœuf, fragment 1-34 de synthèse) a été ensuite analysée. Des réponses significatives ont été obtenues sur les structures suivantes : le glomérule, le tubule proximal, y compris sa portion droite, la partie corticale de la branche ascendante large de l'anse de Henle, enfin la 2<sup>e</sup> portion du tube contourné distal ainsi que la portion « granuleuse » du tubule collecteur qui lui fait suite. La sensibilité élevée de ces structures pour la PTH (seuil de l'ordre de 10 à 20 mU/ml), l'intensité des réponses maximales obtenues (10 à 50 fois l'activité de base) suggèrent que ces structures sont des récepteurs physiologiques de l'action de la parathormone. La nature des effets produits sur ces segments reste à préciser.

b) A Saclay, les études de physiologie rénale par la méthode des microponctions se sont poursuivies ; en collaboration avec C. de Rouffignac, M. Imbert a notamment analysé la composition ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , urée, pression osmotique) du fluide tubulaire des anses de Henle et du plasma sanguin des vasa recta obtenus par microponction à la pointe de la papille chez le *Psammomys* non diurétique, en vue de préciser certains aspects du mécanisme de concentration de l'urine par contre-courant.

c) Durant un séjour d'un an aux U.S.A. dans le laboratoire du D<sup>r</sup> L. Birnbaumer à Chicago, M. Joël Bockaert, aujourd'hui sous-directeur du laboratoire, a étudié la régulation de l'adénylate cyclase membranaire du follicule

ovarien, sous l'influence de l'hormone lutéinisante (LH). L'activité adényl-cyclasique des follicules de rat, de lapin ou de porc est stimulée par la LH (jusqu'à 10 fois ; affinité apparente  $4.5 \times 10^{-10}$  M). Il a été montré que cette régulation par la LH est variable au cours du cycle ovarien. La stimulation est maximale 24 h avant l'ovulation et devient nulle au moment de l'ovulation. Cette « désensibilisation » de l'enzyme suit l'accroissement de la concentration de LH sanguine (pic de LH) qui est une des causes de l'ovulation. Une désensibilisation comparable peut être obtenue *in vitro* en étudiant la réponse à la LH de l'adényl-cyclase des membranes plasmiques du follicule de porc.

La désensibilisation est fonction du temps, de la concentration d'hormone, d'ATP et de  $Mg^{++}$  du milieu d'incubation. Elle n'apparaît pas si on utilise l'AMP-PNP pour remplacer l'ATP. Ceci suggère que la phosphorylation d'un élément cyclasique est impliquée dans le mécanisme de désensibilisation. D'autre part, cette désensibilisation est spécifique du follicule et n'a pas été observée dans le corps jaune (structure dans laquelle on trouve également une adényl-cyclase sensible à la LH).

## II) Etudes d'Endocrinologie moléculaire

Les recherches du groupe animé par S. Jard avec la collaboration de D. Butlen, B. Cantau, J. Penit, R. Rajerison, C. Roy ont porté sur l'analyse des mécanismes d'activation de l'adényl-cyclase rénale par l'hormone anti-diurétique et l'analyse des régulations auxquelles est soumise l'adényl-cyclase des cellules de neuroblastome en culture.

### a) Etudes sur l'adényl-cyclase rénale sensible à l'hormone antidiurétique

Ces études reposent sur un ensemble de travaux antérieurs du groupe ayant abouti à la caractérisation du récepteur moléculaire de l'hormone antidiurétique impliqué dans l'activation de l'adényl-cyclase membranaire et à la définition des relations quantitatives existant entre l'occupation des récepteurs et l'activation de l'enzyme (fonction de couplage). Dans le cas de l'hormone antidiurétique, comme cela a été montré ultérieurement dans d'autres systèmes, la fonction de couplage est non linéaire, ce qui suggère l'existence d'étapes intermédiaires ou une activité indirecte via une modification de structure membranaire. Les études récentes ont porté sur l'analyse de l'action de différents effecteurs du couplage récepteur-adénylate cyclase ; parmi ceux-ci, citons les ions magnésium et les différents cations divalents, les nucléotides guanyliques (GTP - GDP - GP (P-N-P)) et des composés comme les solvants organiques et les anesthésiques locaux, connus pour affecter la structure membranaire.



Parallèlement, l'étude du développement ontogénique de l'adényl-cyclase rénale sensible à la vasopressine a été réalisée chez le Rat. Pratiquement absente à la naissance, la sensibilité de l'adényl-cyclase à la vasopressine augmente rapidement entre 10 et 20 jours pour atteindre la sensibilité mesurée chez l'adulte entre 35 et 45 jours après la naissance. La capacité des membranes à fixer l'hormone et celle de l'enzyme à répondre à une stimulation hormonale suivent une évolution parallèle au cours du développement post-natal.

#### b) Etudes sur l'adényl-cyclase des cellules nerveuses en culture

Sur les cellules de neuroblastome, il a été montré que l'adénosine est un ligand régulateur de l'adényl-cyclase membranaire. Une telle observation suggère que l'accumulation intracellulaire d'AMP cyclique par des tranches de tissu nerveux observée en réponse à l'adénosine exogène ou l'adénosine libérée sous l'influence de stimulations électriques, résulte d'une action directe du nucléoside sur l'adényl-cyclase membranaire, vraisemblablement par l'intermédiaire d'un récepteur extracellulaire spécifique.

Au Collège de France, Joël Prémont (en collaboration avec le groupe de P. Benda) a montré qu'il existe sur les membranes plasmiques des cellules gliales (clone C<sub>6</sub>) une adényl-cyclase sensible aux catécholamines. Le récepteur impliqué est un récepteur bêta adrénergique. Il existe aussi sur ces structures des sites de fixation pour l'isoprotérénol <sup>3</sup>H non assimilables aux récepteurs impliqués dans l'activation de l'adényl-cyclase.

A également été entreprise (J. Bockaert et J. Prémont, en collaboration avec le groupe de J. Glowinski) l'étude des récepteurs à la dopamine du noyau caudé et du cortex frontal.

### III) *Etudes physicochimiques des membranes*

Les recherches du groupe dirigé par Cl. Gary-Bobo ont été poursuivies sur 3 thèmes principaux :

1) L'étude des phénomènes de diffusion dans les systèmes membranaires modèles. Elle a été poursuivie par M. Rigaud, en collaboration avec M. Salmon et Ptack du C.N.R.S. à Orléans. Dans ce domaine, la diffusion des acides gras dans les systèmes lamellaires de lécithine et d'eau a été étudiée en fonction de la longueur de la chaîne (de l'acide formique à l'acide stéarique), de la teneur en eau et du pH du système. Il apparaît qu'au delà de l'acide butyrique, la vitesse de diffusion est commandée par l'implantation de la chaîne aliphatique dans le feuillet lipidique. Cependant, la diffusion est également fortement influencée par l'état d'ionisation du groupe carboxyle,

qui contrôle l'interaction de ce dernier avec les groupements choline phosphate : cet état d'ionisation dépend, à un degré critique, de la structure d'hydratation de la phase. L'étude des spectres de résonance de spin d'acides gras marqués montre de façon concordante, que la localisation à l'interface polaire - non polaire du groupe carboxyle dépend de la teneur en eau de la phase et suggère un changement de conformation des groupements choline phosphate selon leur état d'hydratation.

2) Etude de la translocation de l'ion calcium au niveau du réticulum sarcoplasmique de lapin. M. Champeil a entrepris la mise en évidence des changements de conformation protéique au niveau des sites de transport du calcium par marquage à la N-éthyl-maléimide nitroxydée et étude des spectres de résonance de spin à différentes étapes du cycle de phosphorylation. Des changements de spectre apparaissent dans certaines conditions et en présence de certains ligands qu'il faut analyser pour tenter de les relier aux fonctions de transport.

3) Mécanisme de contrôle par l'ADH de la perméabilité à l'eau et au sodium de la face apicale de la vessie de grenouille. Les recherches entreprises par M. Wietzerbin, auquel s'est joint M. H. Goudeau, ont eu plus particulièrement trait à l'action du Lanthane sur la perméabilité au Na<sup>+</sup>. Dans certaines conditions, le lanthane accroît considérablement le courant de court-circuit, cet accroissement étant additif avec l'action hormonale. L'étude des modifications membranaires induites par l'hormone est également étudiée en utilisant la perméabilisation de la face apicale au Potassium par la Valinomycine comme test de la structure membranaire et de ses modifications par l'hormone.

#### ÉQUIPES RATTACHÉES AU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Les recherches du groupe de Neuroendocrinologie cellulaire dirigé par M<sup>me</sup> A. Tixier-Vidal se sont poursuivies dans trois directions :

##### 1) Mécanismes d'action du TRH (Thyréotrope releasing hormone)

sur la sécrétion de prolactine par des lignées continues de cellules antéhypophysaires de rat (GH3-SD1)

On a étudié la nature du matériel radioactif libéré spontanément à 37 °C par des cellules GH3 ayant préalablement lié le <sup>3</sup>H-TRH pendant 30 minutes suivies de lavages répétés à 4 °C. Ce matériel radioactif présente la même cinétique de liaison, la même capacité de compétition et la même mobilité électrophorétique sur couche mince que le <sup>3</sup>H-TRH de référence.

D'autre part, l'action du TRH sur la cinétique de renouvellement de la prolactine par les cellules SD1 a été analysée à l'aide d'expériences de chasse. On met en évidence ainsi un effet primaire rapide du TRH sur la libération d'un pool préformé de prolactine et une action stimulante secondaire sur la néosynthèse de l'hormone (chercheurs : D. Gourdji, A. Morin, F. Bournaud — collaboration : P. Fromageot, J.-L. Morgat, laboratoire de Biochimie du département de Biologie du CEA).

## 2) Mécanismes cellulaires et subcellulaires réglant la fonction gonadotrope au niveau antéhypophysaire

L'étude par immunocytoenzymologie ultrastructurale des cellules gonadotropes dans l'antéhypophyse intacte ou cultivée en monocouche montre que la dualité d'organisation ultrastructurale de ces cellules ne correspond pas à une dualité immunologique. Elle conduit à l'hypothèse d'une origine cellulaire commune des hormones gonadotropes LH et FSH. L'étude cinétique des modifications ultrastructurales induites dans des cellules gonadotropes cultivées par le LHRH (Lutenizing hormone releasing hormone) montre une modification rapide (15 à 30 minutes) de la membrane plasmique et des structures cytoplasmiques sous-jacentes (chercheurs : C. Tougard, et A. Tixier — collaboration : M. Jutisz et B. Kerdelhue, laboratoire des Hormones polypeptidiques du C.N.R.S.).

## 3) Culture de cellules hypothalamiques de souris fœtales

Une lignée cellulaire continue (HT g) a été obtenue par transformation virale (SV 40) de cultures primaires de cellules hypothalamiques de fœtus de souris. Cette lignée a été clonée. Un des clones (C7) a été caractérisé morphologiquement (ultrastructure), chimiquement (séparation d'un matériel protéique après incorporation de <sup>35</sup>C- cystéine, filtration sur Séphadex, électrofocalisation) et immunologiquement (dosages radioimmunologiques et localisation immunocytologique de neurophysine et de vasopressine). Les recherches se poursuivent sur d'autres clones et sous clones de cette souche (chercheurs : F. de Vitry, A. Faivre, A. Tixier — collaboration : P. Cohen, laboratoire de Biochimie du département de Biologie du CEA et Université Paris VI, D<sup>r</sup> P. Czernichow, Hôpital des enfants malades, Paris).

Les recherches poursuivies par M. Benda en neurobiologie cellulaire ont porté essentiellement sur les cellules hypothalamiques fœtales en culture, en collaboration avec M<sup>me</sup> Tixier-Vidal et son équipe.

En outre, l'étude de la capture de certains acides aminés par les cellules gliales et neuronales a été poursuivie.

Enfin, l'effort pour obtenir des antisérums actifs à l'égard de certaines enzymes du système cholinergique a permis de préciser les réactions croisées entre diverses espèces.

Enfin, M. Cehovic et ses collaborateurs ont poursuivi leur étude des nucléotides cycliques comme médiateurs intracellulaires des fonctions hormonales de l'hypophyse. Cette analyse a pu être approfondie grâce à la synthèse de 17 nouveaux analogues de l'AMP cyclique.

Parmi les analogues butyrylés, aux mono et dibutyrylés, vient s'ajouter une nouvelle génération possédant 3 groupements butyrylés ; ces dérivés tributyrylés sont très actifs sur la fonction prolactinogène de l'hypophyse.

S'il est encore difficile d'établir une corrélation entre la structure des analogues et leur degré d'activité biologique, un fait marquant se dégage néanmoins, en relation avec la relative spécificité d'action de ce corps. Certains analogues, comme le Dibutyryl-8-thio-AMPc, très actifs sur la sécrétion de l'hormone de croissance, n'ont qu'un effet marginal sur la fonction thyroïdienne, par contre, d'autres dérivés comme le 8-amino-AMPc, très forts stimulateurs thyroïdiens, ne montrent qu'un faible effet sur la libération de l'hormone de croissance.

Des recherches en cours sur ce problème de la spécificité d'action des nucléotides cycliques, pourraient aider à mieux connaître le mécanisme d'action de l'AMP cyclique au niveau des sites cellulaires. Elles pourraient aussi ouvrir la voie à d'autres études en vue de certaines applications thérapeutiques des nucléotides cycliques.

#### PUBLICATIONS

N. ROINEL, J. GUERNET, M. LEPAREUR, J.-P. RICHARD, G. ROBIN, F. MOREL, *The automatic analysis of dried  $10^{-10}$  volume samples (Proc. 7th Int. Conference on the X-ray microanalysis, Moscow-Kiev, 9-16 July 1974).*

C. DE ROUFFIGNAC, M. IMBERT and F. MOREL, *Sodium and urea concentration in Henle's loops and vasa recta (Proc. XXVI Int. Congr. Physiol. Sci., 9, p. 387, 1974, New Delhi).*

H. KUNTZIGER, C. AMIEL, N. ROINEL and F. MOREL, *Effects of parathyroidectomy and cyclic AMP on renal transport of phosphate, calcium and magnesium (Amer. J. Physiol., 227, p. 905-911, 1974).*

F. MOREL, M. IMBERT, D. CHABARDES, *A PTH activated adenyl-cyclase in isolated rabbit glomeruli* (*Proc. XXVI Int. Congr. Physiol. Sci.*, vol. XI, p. 387, 1974, New Delhi).

M. IMBERT, D. CHABARDES, F. MOREL, *Hormone-sensitive adenylate cyclase in isolated rabbit glomeruli* (*Molecular and Cellular Endocrinology*, 1, p. 295-304, 1974).

M. IMBERT, D. CHABARDES, M. MONTEGUT, A. CLIQUE and F. MOREL, *Adenylate cyclase activity along the rabbit nephron as measured in single isolated segments* (*Pflügers Archiv*, 354, p. 213-228, 1975).

D. CHABARDES, M. IMBERT, A. CLIQUE, M. MONTEGUT and F. MOREL, *PTH sensitive adenyl-cyclase activity in different segments of the rabbit nephron* (*Pflügers Archiv*, 354, p. 229-239, 1975).

D. CHABARDES, M. IMBERT et F. MOREL, *Sites d'action de la parathormone le long des différents segments des nephrons du Lapin* (Communication à la réunion des Physiologistes de langue française, Montpellier, 1975).

M. IMBERT, D. CHABARDES, F. MOREL, *Sites d'action de la vasopressine le long des différents segments des nephrons du Lapin* (Communication à la réunion des Physiologistes de langue française, Montpellier, février 1975).

F. MOREL, D. CHABARDES, M. IMBERT, *Sites d'action de la vasopressine et de la parathormone le long des différents segments du nephron* (*Actualités Nephrologiques de l'Hôpital Necker*, Paris, 4 juin 1975).

D. CHABARDES, P. POUJEOL, S. DEISS, J.-P. BONVALET and C. de ROUFFIGNAC, *Intrarenal glomerular filtration rate distribution in salt loaded rats* (*Pflügers Archiv*, 1974, 349, p. 191-202).

P. POUJEOL, D. CHABARDES, N. ROINEL et C. de ROUFFIGNAC, avec la collaboration de P. PHILIPPE et P. MALOREY, *Etude des mouvements de phosphate le long du nephron chez le rat* (Communication à la réunion des Physiologistes de langue française, Strasbourg, 1974).

L. BIRNBAUMER, J. BOCKAERT, M. DUNN, V. PLISKA and A. GLATTFELDER, *On the modes of regulation of intracellular cyclic AMP : desensitization of adenyl cyclases to hormonal stimulation and compartmentalization of cyclic AMP in regulation of function and growth of eucaryotic cells by intracellular cyclic nucleotides* (J. E. Dumont, R. W. Butcher and B. Brown eds, Plenum Press, London, 1975).

J. BARTH, C. ROY, R. RAJERISON and S. JARD, *Renal adenylate cyclase activation by amino-acylated vasopressin and oxytocin* (*Mol. Cell. Endocrinol.*, 2, p. 69-79, 1975).

T. BARTH, R. RAJERISON, C. ROY and S. JARD, *Activation of rat kidney adenylate cyclase by vasopressin analogues : lack of correlation with anti-diuretic activity (Mol. Cell. Endocrinology, 2, p. 81-90, 1975).*

C. ROY, T. BARTH and S. JARD, *Vasopressin-sensitive kidney adenylate cyclase-structural requirements for attachment to the receptor and enzyme activation : studies with oxytocin analogues (J. Biol. Chem., p. 250, 1975).*

— *Vasopressin-sensitive kidney adenylate cyclase-structural requirements for attachment to the receptor and enzyme activation : studies with vasopressin analogues (J. Biol. Chem., p. 250, 1975).*

S. JARD, *Adrenergic receptors in epithelia (in Drug and transport processes, B. A. Callingham Ed., Mc Millan, London).*

J. PREMONT, P. BENDA and S. JARD, *<sup>3</sup>H-norepinephrine binding by rat glial cells in culture. Lack of correlation between binding and adenylate cyclase activation (Biochim. Biophys. Acta, 381, p. 368-376, 1975).*

S. JARD, C. ROY, R. RAJERISON, T. BARTH, J. BOCKAERT, *Caractérisation du récepteur rénal de l'hormone antidiurétique (J. Urol. Nephrol., 80, p. 961, 1975).*

J. WIETZERBIN, Y. LANGE and C. M. GARY-BOBO, *Lanthanum inhibition of the action of oxytocin on the water permeability of the frog urinary bladder : Effect on the serosal and the apical membrane (J. Membrane Biology, 17, p. 27, 1974).*

Y. LANGE, C. M. GARY-BOBO, *Ion diffusion selectivity in lecithin-water lamellar phases (J. Gen. Physiol., 63, p. 690, 1974).*

J. L. RIGAUD, C. M. GARY-BOBO and C. TAUPIN, *Effect of chemical Modifiers of passive permeability on the conformation of spin-labelled erythrocyte membranes (Biochim. Biophys. Acta, 373, p. 211, 1974).*

#### *Publications des groupes rattachés au laboratoire*

F. DE VITRY, M. CAMIER, P. CZERNICHOW, P. BENDA, P. COHEN and A. TIXIER-VIDAL, *Establishment of a clone of mouse hypothalamic neuro-secretory cells synthesizing neurophysin and vasopressin (Proc. Nat. Acad. Sci., 71, p. 3573-3579, n° 9, 1974).*

A. TIXIER-VIDAL, *Ultrastructure of anterior pituitary cells in culture (In The anterior pituitary, Ed. by A. Tixier-Vidal and M. Farquhar, Academic Press, p. 181-230, 1975).*

A. TIXIER-VIDAL, D. GOURDJI, C. TOUGARD, *A cell culture approach to the study of pituitary cells (International Review of Cytology, Ed. by Bourne and Danielli, 41, p. 173-239, 1975).*

R. PICART et A. TIXIER-VIDAL, *Description d'une méthode permettant la sélection et l'étude ultrastructurale de plages cellulaires dans des monocouches hétérogènes cultivées en flacons de plastique (J. de Microscopie, 20, p. 80, a, 1974).*

C. TOUGARD et A. TIXIER-VIDAL, *Cinétique d'action du LH-RH sur les cellules gonadotropes de rat en culture primaire. Etude ultrastructurale et immunocytochimique (J. de Physiologie, 68, 11 B, 1974).*

F. DE VITRY, M. CAMIER, P. CZERNICHOW, P. BENDA, P. COHEN and A. TIXIER-VIDAL, *Characterization of a clonal strain of mouse hypothalamic cells synthesizing neurophysins and vasopressin (Annals of the New York Acad. of Sci., 248, p. 64, 1975).*

A. TIXIER-VIDAL et D. GOURDJI, *Mécanisme d'action du TRH (Thyreotrope releasing hormone) sur la cellule antéhypophysaire (In Problèmes actuels d'Endocrinologie et de nutrition, Série n° 18, Le cerveau et les hormones, p. 65-85, 1974).*

A. TIXIER-VIDAL, E. BACSY, C. TOUGARD et R. PICART, *Culture de cellules du lobe intermédiaire de l'hypophyse de rat. Etude ultrastructurale et immunocytochimique (Colloque annuel de la Société Française de Microscopie électronique, Paris, 7-8 février 1975. Journal de Microscopie et de Biologie cellulaire, 22, p. 38 a).*

A. FAIVRE-BAUMAN, J. ROSSIER and P. BENDA, *Glutamate accumulation by a clone of glial cells (Brain Research, 76, p. 371-375, 1974).*

S. BOURGOIN, A. FAIVRE, P. BENDA, J. GLOWINSKI and M. HAMON, *Plasma tryptophan and 5-HT metabolism in the CNS of the newborn rat (J. Neurochem., 23, p. 319-327, 1974).*

M. GARBAG, M. BAUDRY, P. BENDA and J.-C. SCHWETZ, *Simultaneous presence of histamine-N-methyltransferase and catechol-O-methyltransferase in neuronal and glial cells in culture (Brain research, 83, p. 538-541, 1975).*

J. ROSSIER, A. BAUMAN, F. RIEGER and P. BENDA, *Immunological studies on the enzymes of the cholinergic system in (Cholinergic Mechanisms, edited by P. Waser, Raven Press, New York, p. 283-292, 1975).*

G. CEHOVIC, N. B. GIAO, M. BAYER and Th. POSTERNAK, *Stimulation of thyroidal function by various cyclic nucleotides in mice in vivo (56th annual meeting Endocrine Society, Atlanta, June 1974, Abstr. 333).*

N. B. GIAO, G. CEHOVIC, M. BAYER, H. GERGELY and Th. POSTERNAK, *Action de trois nouveaux analogues thio butyrylés de l'AMP cyclique sur la libération et la synthèse de la Prolactine par l'hypophyse de rat in vitro* (10<sup>e</sup> Rencontre internationale de Chimie thérapeutique, Lille, septembre 1974, Abst., p. 54).

Th. POSTERNAK, N. B. GIAO, G. CEHOVIC, *Synthesis of two new cAMP derivatives and their effect on GH release by rat pituitaries in vitro* (accepté pour publication BBA).

N. B. GIAO, G. CEHOVIC, M. BAYER, H. GERGELY, Th. POSTERNAK, *Action comparée de trois dérivés thio butyrylés de l'AMP cyclique sur la libération et la synthèse de la Prolactine hypophysaire* (C. R. Acad. Sci. Paris, sér. D, t. 279, p. 1705, 1974).

G. CEHOVIC, M. BAYER, H. GERGELY and N. B. GIAO, *A new series of cAMP derivatives with relative specific potency on different hormonal functions* (57th Annual meeting Endocrine Society, New York, june 1975, Abstr.).

#### MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS

M. François MOREL a été invité à faire un rapport ou un exposé : à la réunion de l'European society for pediatric Research (joint meeting, 1974, Lausanne), à la réunion organisée conjointement par la Royal microscopical Society et la Société française de Microscopie électronique sur les applications de la micro-analyse en biologie (Paris), au XXVI<sup>e</sup> Congrès international des Physiologistes (New Delhi) ; il a également effectué une mission scientifique à Rabat à l'invitation du Doyen de la Faculté des Sciences. M. S. JARD et/ou ses collaborateurs ont été invités à présenter des exposés : à la 2nd International Conference on cyclic AMP (Vancouver), à la Gordon Conference on Mechanisms of Hormone action, dans le cadre du Nato Course on « role of cyclic AMP in biological functions » (Namur), à une réunion sur « the cell surface membrane receptors » (U.S.A.) ; M. J. BOCKAERT a été invité à participer au 2<sup>e</sup> congrès sur les nucléotides cycliques (Vancouver) et à faire un exposé à la Gordon Conference sur le mécanisme d'action des hormones (U.S.A.). M<sup>lles</sup> D. CHABARDES, et M. IMBERT ont présenté une communication à la réunion des physiologistes de langue française (Montpellier). MM. François MOREL, GARY-BOBO ainsi que plusieurs autres chercheurs du laboratoire ont participé à une réunion organisée par la D.G.R.S.T. groupant les contractants de l'A.C.C. « membranes biologiques » (La Baule). M<sup>me</sup> TIXIER-VIDAL a été invitée à faire des conférences à la Faculté de



Médecine de Marseille ainsi qu'au Friederich Miescher Institut de Bâle ; M<sup>lle</sup> A. GOURDJI a effectué un voyage d'étude dans diverses unités de l'Inde du Nord où elle a fait des conférences ; divers chercheurs du groupe de M<sup>me</sup> TIXIER-VIDAL ont participé au Symposium international sur les Hormones hypothalamiques (Italie), à la « Fifth International conference on immunofluorescence and related staining techniques » (Leiden), à la conférence internationale sur les neurophysines (New York) et à l'EMBO course on « Molecular Neurobiology in vitro » (Cologne). M. P. BENDA a participé à des réunions en Allemagne et en Suisse. Enfin, M. G. CEHOVIC a été invité à la réunion sur « le rôle de l'AMP cyclique dans le système nerveux central » (Strasbourg), à la 2nd Inter. Conference on Biology Pharmacology of cyclic of cyclic AMP (Canada) et à diverses réunions aux Etats-Unis.

#### NOMINATIONS, PROMOTIONS, DIPLÔMES ET THÈSES

M. François MOREL a été fait Docteur Honoris Causa de la Faculté de Médecine de l'Université de Genève, M. Joël BOCKAERT a été nommé sous-directeur du Laboratoire de Physiologie cellulaire du Collège de France. M. Philippe CHAMPEIL a soutenu un diplôme DERBH, M. J.-L. RIGAUD ainsi que M. J. PREMONT ont été nommés assistants à l'Université de Paris VI. M<sup>lle</sup> A. MORIN a soutenu une thèse de 3<sup>e</sup> cycle.