

Physiologie cellulaire

M. François MOREL, professeur

Le cours a porté cette année sur l'étude de « l'ontogénèse du rein et de ses fonctions ».

Le déterminisme de l'organogénèse morphologique et fonctionnelle représente aujourd'hui encore l'un des aspects les plus mal compris de la biologie. En plus des processus de différenciation cellulaire et tissulaire, qui s'échelonnent au cours de la maturation de l'embryon et dont le déterminisme pose déjà des problèmes de biologie cellulaire redoutables, la morphopoïèse des organes eux-mêmes à partir de quelques types cellulaires implique des mécanismes précis et strictement coordonnés dont la nature est encore très controversée, voire inconnue.

La première partie du cours a été consacrée à rappeler en quels termes généraux se pose ce type de problématique biologique, puis à résumer les données acquises durant les dernières années sur quelques systèmes particulièrement favorables en raison des commodités expérimentales qu'ils offrent. Il s'agit en général d'organismes capables de régénération, tels l'hydre d'eau douce, certains insectes à métamorphoses incomplètes, ou encore diverses espèces d'amphibiens urodèles.

Chez l'hydre, les recherches récentes de divers auteurs, dont GIERER et col. notamment, suggèrent que le processus de régénération de la partie manquante qui se produit après transection de l'animal, de même d'ailleurs que le processus de reproduction par bourgeonnement que présente normalement cet organisme, résulterait de l'action de médiateurs chimiques locaux (dits « morphogènes ») dont les gradients tissulaires de concentration contrôleraient (par stimulation ou inhibition, selon les cas) la multiplication et la différenciation des types cellulaires. Des substances douées de propriétés activatrices ou inhibitrices de la régénération auraient d'ailleurs été extraites à partir d'hydres ; il s'agirait de petits polypeptides dont la structure reste encore à déterminer.

Chez certaines espèces d'insectes comme la blatte par exemple, les champs embryonnaires secondaires, une fois déterminés chez l'embryon, gardent, en cas de mutilation partielle, la capacité de régénération pendant la durée de la vie larvaire. C'est ainsi qu'après la section d'une patte chez la blatte, on observe l'apparition d'un bourgeon de régénération au niveau de la lésion ; lors de la mue suivante, ce bourgeon donne naissance à un régénérat qui présente jusque dans ses moindres détails morphologiques tous les caractères de la portion manquante. BULLIERE et FRENCH d'une part, BOHN d'autre part, ont particulièrement bien étudié les modalités de ce processus lorsque des opérations associant ablation et greffe sont pratiquées sur un membre de l'insecte. Selon le niveau de l'ablation, la nature du segment greffé et son orientation, la réponse régénératrice est extrêmement variable : elle va de la simple cicatrisation si la partie enlevée est regreffée en position normale, jusqu'à la pousse de deux membres miniatures surnuméraires (insérés en position opposée au niveau de la zone de suture) si la greffe est constituée par le fragment symétrique de celui qui a été enlevé (par exemple, gauche pour droit). De même, si moignon et greffon ont été sectionnés à des niveaux différents le long de l'axe proximo-distal, le segment intermédiaire manquant est régénéré ; si le fragment greffé est plus long que la partie amputée, le segment intercalaire régénéré se trouve en surnombre et en position inverse de la normale. Ces diverses expériences de greffe montrent que les modalités de régénération font intervenir deux types de commande : un déterminisme génétique spécifie la différenciation des types cellulaires ; une information positionnelle (épigénétique) commande l'organisation spatiotemporelle de ces éléments (morphopoïèse) ; cette information positionnelle elle-même s'est constituée au cours de l'histoire ontogénique antérieure de la larve, et principalement pendant le développement embryonnaire.

Des expériences de même nature ont été réalisées chez le triton par divers auteurs et notamment par BRYANT ; elles ont abouti à des régénérations dont les caractères essentiels sont en tous points comparables à ceux décrits ci-dessus pour la blatte, bien qu'ici la régénération soit obtenue sur une espèce du groupe des vertébrés, dont l'organisation anatomique générale (endosquelette osseux au lieu d'exosquelette chitineux par exemple) est essentiellement différente de celle des arthropodes. La notion d'information positionnelle répondant à un système de coordonnées linéaires pour l'axe proximo-distal et circulaires pour les directions antéro-postérieures et ventro-dorsale semble donc avoir une signification d'une relative généralité, du moins chez les organismes capables de régénération. Elle permet en effet de prévoir, avec parfois une bonne précision, les modalités de la régénération qui sera observée en fonction de la dimension et de l'orientation de la greffe effectuée.

Chez les homéothermes et notamment sur l'œuf de poule, les expériences

de J.W. SAUNDERS et col. ont permis d'étudier les modalités de la morphogénèse des membres durant les premiers stades de leur développement. Les résultats obtenus suggèrent, là encore, la présence d'une information positionnelle évoluant en fonction du temps et qui pourrait résulter de la présence de gradients de concentration de substances morphogènes.

Comme l'a écrit WOLPERT récemment (1978) en parlant du problème de morphogénèse (« pattern formation ») : « tout se passe comme s'il s'agissait d'un processus à deux étapes : d'abord les cellules acquièrent une information positionnelle qui leur est assignée, puis elles interprètent cette information en accord avec leur programme génétique. »

Après ces considérations d'ordre général, le cas particulier de l'ontogénèse du rein (métanéphros) des mammifères a été analysé avec beaucoup de détail. Les expériences démontrant le rôle inducteur joué par le canal de WOLFF dans la différenciation du mésonéphros, ou encore de l'ébauche urétérale dans l'induction de la différenciation du métanéphros ont été rappelées et discutées. Puis les différentes étapes de l'organogénèse du rein ont été décrites, en insistant sur celles des données disponibles qui seraient susceptibles de mettre sur la voie des mécanismes sous-jacents.

L'organogénèse du bassin et des calyces résulte de l'allongement et des premières divisions successives de l'ébauche urétérale dans le blastème métanéphrique. A ce stade, le bourgeon terminal des canaux n'induit pas la formation de néphrons, mais seulement la différenciation du tissu conjonctif du pelvis ; le mésenchyme, à son tour, contrôle la différenciation des structures épithéliales d'origine canaliculaire et, notamment, par régression des cloisons intermédiaires, la formation de la cavité du bassin, puis celle des calyces.

Dans une deuxième phase de l'organogénèse du rein, l'allongement et surtout les divisions de l'ampoule terminale de chacun des canaux dérivés du bourgeon urétéral induisent la formation d'une vésicule dans le blastème métanéphrique. Chaque vésicule, après s'être abouchée dans l'ampoule correspondante, donnera naissance à un néphron complet. Ainsi se formera progressivement, dans la deuxième partie de la vie intra-utérine, puis après la naissance, le cortex rénal, par croissance centrifuge et formation de nouvelles générations successives de néphrons. Il convient d'ailleurs de noter que ces processus évoluent sensiblement dans leurs modalités de détail au cours de l'ontogénèse du métanéphros : ainsi, l'organisation topographique des néphrons juxtamedullaires, les premiers formés, est-elle différente de celle des néphrons sous-capsulaires de la surface du rein, les derniers formés, en ce sens que les segments « connecteurs » des premiers peuvent constituer, par coalescence, des « arcades » branchées, ce qui ne s'observe jamais dans le cas des seconds.

*
**

Le déterminisme (à défaut des mécanismes moléculaires) responsable de ce processus d'induction de la différenciation des néphrons par l'ampoule urétérale a pu être analysé expérimentalement avec quelque précision, grâce aux possibilités offertes par la culture *in vitro* d'ébauches embryonnaires. En effet, si l'on met en culture de part et d'autre d'une membrane poreuse appropriée, le blastème métanéphrique d'un côté, l'ébauche urétérale de l'autre, on observe, après un temps de latence d'environ vingt-quatre heures, l'induction par l'épithélium urétéral — et à travers le filtre — de vésicules dans le blastème métanéphrique. Ces vésicules se différencient ensuite *in vitro* en « corps en forme de S », puis en ébauches glomérulaires et tubulaires selon une chronologie et une morphopoïèse analogues à celles observées dans le rein embryonnaire *in situ*. Ce dispositif expérimental *in vitro*, exploité par GROBSTEIN puis, surtout, par SAXEN et collaborateurs, a permis l'étude systématique, morphologique, biochimique et enzymatique, des étapes successives de la différenciation des cellules du métanéphros au cours du processus d'induction des néphrons. Les principaux résultats publiés à ce jour ont été discutés en détail dans le cours.

*
**

Quant au type de mécanisme moléculaire par lequel les cellules de l'ampoule induisent dans le mésenchyme la différenciation de vésicules, il est encore controversé.

Le fait que ce processus d'induction puisse s'effectuer au travers de membranes de porosité contrôlée (diamètre des pores de 0,2 à 0,4 μm) et surtout d'épaisseur notable (25 μm et même davantage) avait fait postuler, dans un premier temps, la diffusion d'un ou de plusieurs médiateurs chimiques au travers de la membrane plutôt que l'existence de contacts intercellulaires directs entre cellules inductrices et cellules induites. Cependant, cette interprétation a été remise en cause récemment, lorsqu'il a été démontré que des cellules urétérales sont capables, en quelques heures au maximum (moins qu'il n'en faut pour observer les premiers signes de réponse), d'émettre des pseudopodes très fins qui remplissent presque tous les pores de la membrane et la traversent complètement pour faire saillie sur sa face opposée. En faisant varier le type de membrane utilisée, on observe en outre une bonne corrélation entre l'efficacité de l'induction obtenue et le nombre des pseudopodes formés au travers de la membrane.

Si donc un mécanisme impliquant des contacts intercellulaires directs ne saurait être formellement exclu par ces expériences, il reste que l'hypothèse

de la libération de médiateurs chimiques agissant à courte distance et selon un « gradient » de concentration reste plus vraisemblable, puisqu'aussi bien : 1) dans les conditions normales, l'ampoule et le canal dérivés de l'uretère (le tissu inducteur) sont entourés de toutes parts par une membrane péritubulaire extracellulaire continue au travers de laquelle on n'observe pas la formation de prolongements cellulaires visibles au microscope électronique, et pourtant l'induction se produit, et, 2) *in vitro*, l'induction intéresse bien, dans un premier temps, les cellules du blastème au contact avec la membrane artificielle, mais elle se propage ensuite aux couches cellulaires voisines qui ne sont plus en contact direct avec cette membrane, et qui pourtant vont aussi se différencier en vésicules.

*

**

Lorsque les étapes critiques de l'ontogénèse du rein — et en particulier celle de l'induction des néphrons — sont envisagées non plus du point de vue de l'embryologie, mais du point de vue physiologique (initiation d'une activité fonctionnelle), un hiatus important se manifeste. Pour un néphron donné, les premiers signes d'activité physiologique se manifestent avec le démarrage de la filtration glomérulaire et la maturation des systèmes de transport tubulaires. Or ces fonctions apparaissent à un stade où la différenciation morphologique et cellulaire du glomérule et des principaux segments tubulaires est déjà très avancée, même si, pour le rein tout entier, l'activité physiologique des premiers néphrons formés s'installe bien avant que les ébauches des dernières générations de néphrons ne soient encore induites. Ce décalage chronologique, ainsi que la très grande hétérogénéité de maturation de la population totale des néphrons à un stade donné du développement rendent malheureusement difficiles les études expérimentales précises visant à établir le rôle éventuel du démarrage des fonctions physiologiques dans les mécanismes de stabilisation de la différenciation des types cellulaires qui forment les parois tubulaires.

F.M.

SÉMINAIRES

Quatre séances de séminaires ont été organisées, portant sur des sujets de Physiologie cellulaire en rapport avec les mécanismes d'action de divers médiateurs et hormones. Chaque séance, d'une durée de deux heures, a comporté deux exposés, suivis de discussions, selon le programme suivant :

I. M. J.F. BACH : Les hormones thymiques.

M. L. CHEDID : Activité biologique d'un immunoadjuvant de synthèse, le MDP.

II. M. Cl. KORDON : Régulation de la sécrétion des neuropeptides par les neuromédiateurs.

M. P. MEYER : Mécanismes de l'hypertension artérielle essentielle.

III. M. ROSSELIN : Caractérisation du récepteur au VIP dans les cellules épithéliales de l'intestin.

M. STROSBURG : Progrès dans la purification des récepteurs adrénergiques.

IV. M. J. JUNEZ : Hormones thyroïdiennes et développement du système nerveux central.

..M. PROCHIANTZ : Développement et différenciation des cellules nerveuses : rôle des interactions cellules-milieu.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Nous résumons ici succinctement les recherches effectuées au cours de l'année écoulée dans les 3 équipes qui constituent le laboratoire de Physiologie cellulaire ; celles réalisées par l'équipe de neuroendocrinologie cellulaire dirigée par Mme TIXIER-VIDAL, rattachée au laboratoire de Physiologie cellulaire, sont décrites à la fin de ce rapport.

1) *Equipe de Physiologie rénale* (D. CHABARDES, A. DOUCET, M. IMBERT-TEBOUL et F. MOREL).

Deux directions principales ont été suivies, qui prolongent les orientations définies dans nos précédents rapports.

a) *Etude de la distribution de l'ATPase Na-K dépendante le long des néphrons.*

La microméthode enzymatique mise au point au laboratoire a été systématiquement utilisée en routine pour explorer les distributions relatives des ATPases totales et Na-K dépendantes dans 10 segments différents des néphrons du Lapin. Puis une étude comparable a été également conduite sur le rein de la Souris et du Rat (au moins sur les segments qu'il est possible d'isoler par microdissection après perfusion du rein par la collagénase). Chez

les 3 espèces, l'activité enzymatique activable par les ions Na^+ et K^+ représente 50 à 80 % de l'activité ATPasique totale, selon les segments. Les segments de beaucoup les plus riches en enzyme (par mm de longueur tubulaire ou par mg de protéines totales) sont ceux qui constituent la portion distale des néphrons (branche large ascendante de l'anse, tubule contourné distal). Le canal collecteur et le tubule proximal sont beaucoup moins riches en enzyme, tandis qu'il est à peine décelable dans le segment grêle.

b) *Etude de la distribution de l'adenylate-cyclase hormone-dépendante le long des néphrons.*

Ce programme, poursuivi depuis plusieurs années déjà, a été complété sur plusieurs points. Il a notamment été recherché si les réponses enzymatiques à l'hormone pouvaient être modulées *in vitro* en ajoutant soit des prostaglandines, soit des nucléotides guanyliques au milieu d'incubation. Contrairement à ce qui a été décrit dans le cas de fractions membranaires isolées à partir d'homogénats tissulaires, et pour lesquels ces agents modifient en général de façon notable l'activité de l'adényl-cyclase, il n'a pas été observé d'effet significatif dans les conditions des microdosages enzymatiques sur segments microdisséqués. La différence pourrait résulter du fait que ces fragments, non soumis à une destruction mécanique, ont conservé jusqu'au moment du dosage un contenu suffisant en prostaglandines et en nucléotides guanyliques endogènes.

Par ailleurs, les effets inhibiteurs produits par la stimulation du récepteur α adrénergique sur la réponse de la cyclase à d'autres hormones ont été recherchés systématiquement sur les segments médullaires des anses et des canaux collecteurs dans le cas de la vasopressine et sur le tubule proximal dans le cas de l'hormone parathyroïdienne.

Enfin, l'étude de l'ontogénèse de ces réponses enzymatiques au cours de la maturation postnatale du rein a été poursuivie chez le Rat. Il a été notamment observé que, sur certains segments (par exemple la branche ascendante de l'anse de Henle), l'enzyme possède, dès les premiers jours qui suivent la naissance, une réponse comparable à celle de l'adulte pour une hormone donnée (ici la calcitonine), alors que celle à d'autres hormones (ici la vasopressine) apparaît plus tardivement seulement et s'accroît principalement entre la 3^e et la 5^e semaine de la vie.

2) *Etude des récepteurs aux neuromédiateurs* (J. BOCKAERT, M. LUCAS, J. PREMONT, C. EBERSOLT, V. HOMBURGER).

Nous avons poursuivi cette année l'étude des récepteurs à l'adénosine, la dopamine et aux catécholamines dans le système nerveux central et les cellules gliales en culture.

a) *Le récepteur à l'adénosine.* De nombreuses observations suggèrent que l'adénosine peut être un neuromodulateur dans le système nerveux central (SNC). Nous avons précédemment montré que l'adénosine stimule une adényl cyclase membranaire dans des homogenats de noyau caudé du rat en interagissant avec un récepteur spécifique. Les caractéristiques de cette stimulation ont été précisées. Comme les autres neuromédiateurs, l'adénosine augmente la vitesse maximale de la réaction sans modifier l'affinité pour le substrat, l'ATP-Mg⁺⁺. Elle augmente par contre l'affinité pour le Mg⁺⁺ au niveau du site régulateur. La présence de GTP est indispensable à la stimulation. Des fractionnements subcellulaires montrent que le récepteur à l'adénosine couplé à une adényl cyclase est essentiellement localisé au niveau des terminaisons nerveuses. Ce récepteur n'est pas présent dans toutes les structures du SNC, mais seulement dans le noyau caudé, l'accumbens, le globus pallidus, le tubercule olfactif, le bulbe olfactif et le cervelet postérieur. Sa répartition au sein du noyau caudé est aussi hétérogène. Ceci suggère que ce récepteur est localisé au niveau de synapses bien spécifiques et non pas sur des éléments gliaux par exemple. De plus, il disparaît après injection d'acide kainic dans le noyau caudé ; ce traitement entraîne la dégénérescence des neurones dont les corps cellulaires sont dans cette structure sans altérer les cellules gliales.

b) *Le récepteur à la dopamine couplé à une adényl cyclase du cortex frontal du rat*

Nous avons montré précédemment que le cortex frontal de rat contient une adényl-cyclase sensible à la dopamine. Les relations avec l'innervation dopaminergique de cette structure ont été recherchées en collaboration avec J.P. TASSIN, du laboratoire du D^r GLOWINSKI. Le cortex frontal est congelé à — 7 °C et couplé en tranches. Des microdisques (1,5 mm de diamètre) sont prélevés et sur ces disques l'adényl-cyclase sensible à la dopamine est mesurée, ainsi que le contenu en dopamine. Dans cette région, la distribution topographique de l'adényl-cyclase dopamine-sensible est en étroite corrélation avec celle de la dopamine ($r = 0,98$) suggérant que cette enzyme fait partie intégrante de la synapse dopaminergique. Des régions (cortex pariétal par exemple), qui ne contiennent pas de dopamine, ne contiennent pas d'adényl-cyclase sensible à ce neuromodulateur.

c) *Le récepteur β -adrenergique couplé à une adényl-cyclase du système nerveux central et des cellules gliales en culture*

Dans le système nerveux central, il n'est pas évident que les récepteurs détectés avec des antagonistes marqués soient identiques aux récepteurs couplés à une adényl-cyclase. Cette remarque est particulièrement vraie pour les récepteurs à la dopamine et la sérotonine. Nous avons étudié ce problème en ce qui concerne les récepteurs β -adrenergiques. La liaison d'un

β -antagoniste, le dihydroalprenolol, est mesurée dans des conditions identiques à celles utilisées pour mesurer l'adényl-cyclase. On peut ainsi montrer que les affinités d'un grand nombre d'agonistes et d'antagonistes pour la stimulation ou l'inhibition de l'adényl-cyclase sont très bien corrélées avec leurs affinités pour les sites de liaison ($r = 0,98$). Dans le SNC de chat, la répartition topographique des sites de liaison est en étroite corrélation avec l'activité de l'adényl-cyclase sensible aux agonistes β -adrenergiques ($r = 0,93$), mais pas avec le contenu en noradrénaline. Ceci est dû au fait que les terminaisons noradrenergiques innervent à la fois des récepteurs α et β adrenergiques dont les densités relatives sont variables d'une région à l'autre du SNC. Nous avons aussi montré que la dégénérescence des fibres noradrenergiques présynaptiques entraîne une augmentation du nombre des sites de liaison ainsi que de la stimulation de l'adényl-cyclase sensible aux catécholamines. Cependant les cinétiques d'apparition sont différentes. Cette hypersensibilité des deux systèmes peut également être obtenue soit en supprimant la libération de noradrénaline par un traitement chronique à la réserpine, soit par blocage permanent du récepteur avec le propranolol injecté de façon chronique. Il semble donc que les antagonistes β -adrenergiques marquent bien le site impliqué dans l'activation de l'adényl-cyclase.

Enfin, nos efforts pour trouver un marqueur irréversible du récepteur β -adrenergique se sont poursuivis. En collaboration avec R. MICHELOT, nous avons testé des dérivés du propranolol ayant des groupes SH réactifs de façon à les utiliser comme marqueurs d'affinité du récepteur β -adrenergique réduit au dithiothreitol; jusqu'à présent, les résultats sont négatifs.

Par contre, nous avons étudié en détail l'interaction d'un dérivé norbornyl du propranolol qui se comporte comme un marqueur irréversible ou très lentement réversible. Les cinétiques d'interaction *in vitro* rappellent celles observées avec les neurotoxines de serpent. Une seule injection de ce produit (30 mg/kg i.p.) bloque pendant 30 heures les récepteurs β -adrenergiques cérébraux, alors que le propranolol est complètement éliminé après 3 heures. Bien que potentiellement très utile pour un usage clinique, ce produit ne semble malheureusement pas pouvoir être utilisé pour un marquage du récepteur. La fixation non spécifique de ce produit, lorsqu'il est marqué, est trop importante.

3) *Equipe d'endocrinologie moléculaire* (S. JARD, D. BUTLEN, B. CANTAU, G. GUILLON, J. PENIT, R. RAJERISON, C. ROY).

La présente année a été marquée pour l'équipe par l'introduction d'orientations nouvelles de recherche se situant dans le cadre général d'une analyse du mécanisme d'action des peptides neurohypophysaires et plus particulièrement de la vasopressine.

La vasopressine exerce un ensemble très varié d'actions physiologiques ou pharmacologiques (action antidiurétique sur le rein, action contracturante sur la musculature lisse des vaisseaux périphériques, action glycogénolytique sur le foie, stimulation de la sécrétion des cellules corticotropes adénohypophysaires, modification de l'activité électrique de plusieurs zones du système nerveux central, stabilisation des comportements acquis chez l'animal, effet mitogénique sur des fibroblastes en culture, pour ne citer que les effets les mieux décrits sur le plan physiologique). Les mécanismes de transduction de l'information hormonale qui sont impliqués dans ces différentes actions biologiques sont de nature différente. S'il est bien établi qu'une étape primaire de l'action de l'hormone sur la perméabilité à l'eau des segments distaux du néphron est l'activation d'une adénylate cyclase membranaire, il est très vraisemblable que l'AMP cyclique n'est pas impliqué dans les effets vasculaires ou hépatiques de la vasopressine par exemple. Une telle situation apparaît *a priori* très favorable à l'étude d'un ensemble de problèmes parmi lesquels on peut retenir :

1) Celui de l'existence possible d'isorécepteurs. L'approche expérimentale développée consiste à comparer chez la même espèce les récepteurs de différents tissus cibles du point de vue : a) des paramètres cinétiques de leur interaction avec de la vasopressine tritiée ; b) de leur spécificité vis-à-vis d'un ensemble d'analogues de structure de l'hormone ; c) de leur sensibilité aux nucléotides guanyliques (un facteur connu pour être indispensable au couplage fonctionnel entre l'adénylate cyclase membranaire et de nombreux récepteurs hormonaux) ; et d) des paramètres hydrodynamiques du récepteur solubilisé (rayon de Stokes, constante de sédimentation, volume partiel spécifique, poids moléculaire).

Les études effectuées dans ce domaine ont essentiellement porté sur le récepteur de la vasopressine des membranes de foie de rat. Des sites de liaison de l'hormone ont été caractérisés et identifiés aux sites récepteurs impliqués dans son action glycogénolytique en démontrant l'existence de corrélations étroites entre un paramètre de liaison de la vasopressine tritiée sur des membranes purifiées ou des hépatocytes isolés et la réponse finale mesurée par l'activation de la phosphorylase. Ce travail est réalisé en collaboration avec le groupe du Professeur DE WULF de l'Université de Louvain. La spécificité de reconnaissance du récepteur hépatique apparaît très différente de celle du récepteur rénal, mais présente en revanche des analogies frappantes avec celle du récepteur vasculaire. Les paramètres hydrodynamiques de ces deux récepteurs sont significativement différents. Enfin, il a été confirmé que le récepteur hépatique, contrairement au récepteur rénal, n'est pas couplé à une adénylate cyclase membranaire. Cependant, il est intéressant de noter que la fixation de vasopressine tritiée est dans les deux cas sensible à l'action des nucléotides guanyliques.

Les études préliminaires visant à la définition des systèmes biologiques les plus favorables à la caractérisation de plusieurs autres récepteurs de la vasopressine chez le rat sont actuellement en cours.

2) Les facteurs contrôlant l'expression et assurant la modulation de la sensibilité à la vasopressine des différents tissus cibles de l'hormone sont-ils communs pour l'ensemble de ces tissus cibles ou sont-ils plus directement liés à leur spécialisation fonctionnelle? Pour tenter d'apporter un élément de réponse à cette question, il est envisagé de comparer : a) les modalités du développement ontogénique de différents récepteurs de différents types dans un ensemble de situations physiologiques connues (cf. rapports antérieurs), pour affecter celui d'un d'entre eux (le récepteur rénal). Les résultats d'ores et déjà acquis ont montré que les modalités du développement ontogénique du récepteur hépatique de la vasopressine sont indiscernables de celles du développement ontogénique du récepteur rénal.

L'utilisation de clones cellulaires sensibles à la vasopressine pourrait constituer un outil précieux pour l'étude des mécanismes contrôlant l'expression de la sensibilité hormonale. Dans cette perspective, M. Christian ROY a entrepris, au cours d'un stage qu'il effectue aux Etats-Unis, dans le laboratoire du D^r AUSIELLO, la caractérisation du récepteur de la vasopressine dans plusieurs clones de cellules rénales sensibles à l'hormone.

Parallèlement aux travaux mentionnés ci-dessus, plusieurs des programmes expérimentaux développés antérieurement (cf. rapports précédents) ont été poursuivis. En particulier celui concernant l'identification des constituants membranaires impliqués dans l'effet des nucléotides guanyliques sur l'interaction de la vasopressine avec le récepteur rénal d'une part et sur le couplage fonctionnel entre le récepteur et l'adenylate cyclase d'autre part. Le problème posé est celui de la dualité éventuelle des protéines responsables de ces deux effets. L'approche expérimentale développée est celle d'une recombinaison entre différentes fractions séparées après solubilisation des membranes sous l'action de détergents non ioniques.

MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS SUR INVITATION

M. François MOREL a présenté des exposés sur invitation : 1) au 7^e Congrès International de Néphrologie de Montréal en juin 1978, 2) au 4th Symposium Membrane Transport Processes « Cellular mechanisms of renal tubular ion transport », à Yale, en juin 1978, 3) au Colloque anniversaire du centenaire de la mort de Claude Bernard (Paris, décembre 1978), 4) au Congrès annuel de la Société japonaise de pharmacologie (Tokyo, mars 1979).

En outre, M. F. MOREL a été invité à faire des conférences ou séminaires : pour la réunion annuelle de la Société médicale de Genève (Genève, novembre 1978), au National Institute of Health (Bethesda, juin 1978) et devant la Société japonaise de Néphrologie (Tokyo, mars 1979).

M. Serge JARD a été invité à faire un exposé au Congrès International de Néphrologie à Montréal; M^{me} TEBOUL et M^{lle} CHABARDES ont chacune présenté une communication à ce même congrès. M^{lle} CHABARDES a présenté sur invitation une communication à la réunion franco-canadienne de néphrologie de Sherbrook (juin 1978). M. JARD a été organisateur d'un Symposium du 7^e Congrès International de Pharmacologie de Paris (juillet 1978). M. JARD, en outre, a effectué une mission d'étude au NIH en octobre 1978.

M. Joël BOCKAERT a été invité à participer et à présenter ses résultats dans plusieurs réunions internationales : en juin 1978 au Canada (Symposium on « physiological and regulatory functions of adenosine and adenine nucleotides »); en juillet 1978 à Paris (7^e Congrès international de Pharmacologie) ainsi que dans le Symposium satellite de ce congrès sur « recent advances in the pharmacology of adrenoreceptors », enfin, toujours en juillet 1978, à Dresde (12th FEBS meeting).

M^{me} O. GONTCHAREVSKAIA, chercheur à l'Institut Sechenof de l'Université de Leningrad, a fait un séjour dans la laboratoire de Physiologie cellulaire pendant les mois de mai et juin 1978. M. Christian ROY, attaché de recherche au C.N.R.S., effectue une mission de travail aux U.S.A. depuis mars 1979 et pour neuf mois dans le laboratoire du D^r AUSIELLO (Boston).

DISTINCTIONS, PROMOTIONS ET DIPLOMES

M. RAJERISON a soutenu sa thèse de doctorat d'Etat.

M. JARD a été lauréat des Conférences Lacassagne du Collège de France pour l'année 1978-1979.

PUBLICATIONS

G.A. QUAMME, N.L.M. WONG, J.H. DIRKS, N. ROINEL, C. DE ROUFFIGNAC et F. MOREL, *Magnesium handling in the Dog kidney : a micropuncture study.* (*Pflügers Archiv.*, 377, p. 95-99, 1978.)

M. IMBERT-TEBOUL, D. CHABARDES, M. MONTEGUT, A. CLIQUE and F. MOREL, *Impaired response to vasopressin of Adenylate-cyclase of the thick ascending limb of Henle's loop in Brattleboro rats with Diabetes insipidus.* (*Renal Physiology*, 1, p. 3-10, 1978.)

F. MOREL, *Mechanisms and regulation of proximal tubular reabsorption : current aspects.* (*Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society*, 9, p. 53-60, 1978.)

M. GAGNAN-BRUNETTE, D. CHABARDES, M. IMBERT-TEBOUL, A. CLIQUE, M. MONTEGUT and F. MOREL, *Hormone-sensitive adenylate cyclase along the nephron of genetically hypophosphotemic mice.* (*Kidney Intern.*, 15, N. 4, p. 357-369, 1979.)

F. MOREL, D. CHABARDES and M. IMBERT-TEBOUL, *Heterogeneity of hormonal control in the distal nephron.* (*Proceedings at 7th Congress of Nephrology, Montreal*, S. Karger, p. 208-216, 1978.)

D. CHABARDES, M. BRUNETTE, M. IMBERT-TEBOUL et F. MOREL, *Dépendance hormonale de l'activité adénylcyclasique le long du néphron humain.* (*Abstr.*, 7th Congress of Nephrology, Montréal, juin 1978, E-14.)

M. IMBERT-TEBOUL, D. CHABARDES et F. MOREL, *Développement ontogénétique de l'adénylate-cyclase vasopressine dépendante dans le rein du rat.* (*Abstr.*, 7th Congress of Nephrology, Montréal, juin 1978, Q-6.)

F. MOREL, D. CHABARDES and M. IMBERT-TEBOUL, *Hormone dependent adenylate cyclase activity : distribution along the segments of the nephron.* *Lecture at the 52th General Meeting on the Japanese Pharmacological Society*, Tokyo, mars 1979, *Abstr.*, L-7, p. 70-71.)

F. MOREL, D. CHABARDES and M. IMBERT-TEBOUL, *Hormonal control of cyclic AMP generation by isolated nephron segments and its relation to problems of kidney physiology.* (*In « Renal Function »*, Ed. G.H. Giebisch a. E.F. Purcell, Josiah Macy Foundation, p. 275-289, 1978.)

A. DOLPHIN, M. HAMON, J. ADRIEN and J. BOCKAERT, *Identity of [^3H]-dihydroalprenolol binding sites and β adrenergic receptors coupled with adenylate cyclase in the central nervous system : pharmacological properties, distribution and adaptive responsiveness.* (*Molecular pharmacology*, 15, p. 1-15, 1979.)

M. LUCAS, V. HOMBERGER, A. DOLPHIN and J. BOCKAERT, *In vitro and in vivo kinetic analysis of the interaction of a Norbornyl derivative of propranolol with β -adrenergic receptors of brain and C_6 glioma cells; an irreversible or slowly reversible ligand.* (*Molecular Pharmacology*, 15, in press, 1979.)

J. PREMONT, M. PEREZ, G. BLANC, J.P. TASSIN, A.M. THIERRY, D. HERVE and J. BOCKAERT, *Adenosine-sensitive adenylate cyclase in rat brain homogenates : kinetic characteristics, specificity, topographical, subcellular and cellular distribution.* (*Molecular Pharmacology*, in press, 1979.)

J. BOCKAERT, A. ENJELBERT and A. DOLPHIN, *Pharmacological properties, distribution and hemostatic regulation of monoaminergic receptors coupled with an adenylate cyclase in the central nervous system.* (*In Cyclic Nucleotide and protein phosphorylation in cell regulation*, E.G. Krause ed., Pergamon Press, Oxford and New York, p. 33-42, 1979.)

J. BOCKAERT, *Coupling of neurotransmitter receptors with an adenylate cyclase. A tool of studying their pharmacological properties distribution and modulation in the central nervous system.* (*J. Physiol.*, 74, p. 527-533, 1978.)

J.P. TASSIN, J. BOCKAERT, G. BLANC, L. STINUS, A.M. THIERRY, S. LAVIELLE and J. GLOWINSKI, *Topographical distribution of dopaminergic innervation and dopaminergic receptors in the anterior cerebral cortex of the rat.* (*Brain Research*, 154, p. 241-251, 1978.)

J. BOCKAERT and M. LUCAS, *Coupling of β adrenergic receptor with adenylate cyclase in C_6 glioma cells.* (*In Recent advances in the pharmacology of adrenoceptors*, E. Szabadi, C.M. Bradshaw and P. BEVAN, eds. Elsevier/North Holland Biochemical Press, p. 145-152, 1978.)

G. GUILLON, C. ROY and S. JARD, *A systematic study of effects of non-ionic detergents on solubilization and activity of pig kidney adenylate cyclase.* (*Europ. J. Biochem.*, 92, 341-348, 1978.)

D. BUTLEN, G. GUILLON, R.M. RAJERISON and S. JARD, *Structural requirements for activation of vasopressin-sensitive adenylate cyclase, hormone binding and antidiuretic actions : Effects of highly potent analogues and competitive inhibitors.* (*Mol. Pharmacol.*, 14, 1006-1017, 1978.)

Phuong L. TRAN, *Effects of spin-labeled sterates on duck erythrocyte adenylate cyclase.* (*European J. Biochem.*, 93, p. 559-563, 1979.)

S. JARD, *Hormone receptor - Adenylate cyclase relationships.* *In : Cyclic nucleotides and protein phosphorylation in cell regulation.* (Vol. 54, reprinted from *FEBS Federation of European Biochemical Societies 12th Meeting Dresden*, 1978, E.G. Krause et al., eds., Pergamon Press, Oxford and New York, p. 1-10, 1979.)

G. GUILLON, P.O. COURAUD and C. ROY, *Conversion of basal 6.0 S adenylate cyclase into 7.4 by guanyl nucleotide treatment of membrane bound enzyme.* (*BBRC*, 87, N. 3, p. 855-861, 1979.)

EQUIPE RATTACHÉE AU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Les recherches du groupe de Neuroendocrinologie cellulaire dirigé par M^{me} TIXIER-VIDAL se sont poursuivies selon les deux thèmes développés au laboratoire.

1) *Aspects morphologiques et moléculaires de la régulation de la sécrétion de prolactine par des lignées continues de cellules antéhypophysaires de rat.*

L'hypothèse proposée antérieurement d'une action multisite du TRH, neuropeptide hypothalamique, sur ses cellules cibles a continué à diriger les recherches. Au niveau nucléaire, les études antérieures montrant la présence de sites de liaison spécifiques pour le TRH dans une fraction nucléaire purifiée isolée de cellules GH3 ont été confirmées et développées. On a recherché, en particulier, une éventuelle affinité des noyaux pour un métabolisme du TRH, le deamido-TRH (TRH-OH), qui s'accumule dans le cytoplasme et qui est capable d'inhiber partiellement (30 %) la sécrétion de prolactine en 24 h et 48 h de traitement. A l'aide de ³H-TRH-OH préparé par H. LEVINE-PINTO (Service de P. FROMAGEOT, CEA, Saclay), on a pu montrer que ni les cellules intactes, ni les noyaux isolés ne possèdent de sites de liaison dits « spécifiques » pour cet analogue, mais que les caractéristiques de sa liaison sur les noyaux isolés révèlent des propriétés différentes de celles observées au niveau des cellules intactes. La capacité des noyaux à fixer le ³H-TRH-OH pourrait expliquer la rétention intracellulaire de ce métabolite du TRH au fur et à mesure de la dégradation cytoplasmique de ce dernier (J.N. LAVERRIERE et D. GOURDJI). Les recherches se poursuivent sur une localisation plus fine de la liaison du TRH au niveau des structures nucléaires.

Le rôle éventuel de la dégradation du TRH par des enzymes cytoplasmiques spécifiques des deux points de clivage (pyroli-done-décarboxylase et déamidase) a fait l'objet de recherches conduites en collaboration avec K. BAUER (Université technique, Berlin-Ouest). On a pu montrer que le diketopiperazine, résultant de l'action de la pyroli-done-décarboxylase, est capable d'inhiber significativement la libération rapide de prolactine (30 mn) par les cellules en culture, aussi bien qu'*in vivo* (A. FAIVRE-BAUMAN et l'équipe de K. BAUER).

Au niveau de la membrane plasmique, deux aspects des modifications induites par le TRH ont été étudiés. D'une part, on a montré que l'exposition au TRH dans les conditions de réalisation de l'effet biologique à court terme induit une augmentation significative de l'endocytose fluide mesurée par la capture de peroxydase de raifort mise en solution dans le milieu. Par

ailleurs, en collaboration avec B. DUFY et J.D. VINCENT (Unité de Neurophysiologie, INSERM, Bordeaux), on a montré que le TRH induit au niveau de ses cellules cibles et en une minute, un train soutenu de potentiels de membrane dépendant du calcium. Cet effet est suivi d'une désensibilisation progressive.

2) *Différenciation des cellules hypothalamiques au cours du développement fœtal de la souris.*

L'apparition et le développement du neuropeptide hypothalamique TRH ont été suivis *in vivo* et *in vitro* à l'aide d'un dosage radioimmunologique spécifique et sensible à 4 pg, précédemment mis au point. *In vivo*, on montre que le TRH apparaît très précocement (13^e j. de la vie fœtale) et simultanément dans l'hypothalamus et dans le cerveau extra-hypothalamique. Cette apparition coïncide avec celle des premiers signes ultrastructuraux d'une différenciation neuronale dans l'hypothalamus antérieur, mais précède de plusieurs jours la différenciation de terminaisons axonales peptidergiques. Elle est suivie de l'augmentation rapide de la teneur en TRH de ces deux structures. Celle-ci se stabilise provisoirement à la naissance où elle représente un cinquième de la valeur observée chez l'adulte, puis augmente à nouveau après la naissance (FAIVRE-BAUMAE et al., 1978). *In vitro*, des résultats préliminaires ont été publiés, montrant la présence de TRH mesuré par dosage radioimmunologique dans des extraits de cultures primaires de cellules hypothalamiques fœtales dispersées, initiées à deux stades critiques du développement fœtal : 13^e et 16^e jours. En outre, la localisation neuronale de cette immunoréactivité a été mise en évidence en microscopies optique et électronique et la spécificité de cette localisation a été établie.

MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS

M^{me} TIXIER-VIDAL et/ou certains de ses collaborateurs ont participé aux réunions scientifiques suivantes : Round Table on « Neoplastic Transformation in Differentiated Epithelial Cell System In Vitro » (Imperial Cancer Research Fund Laboratories, London, 29-30 juin 1978, « Réunion du Groupe Peptides » D.G.R.S.T., juin 1978, Cold Spring Harbor Symposium on « Hormones and Cell Culture » (U.S.A., 29 août - 3 septembre 1978), Colloque International sur « Synthesis and Release of adeno-hypophysial Hormones, Cellular and Molecular Mechanisms » (Seillac, septembre 1978), Réunion annuelle de la Société Française de Neuroendocrinologie Expérimentale (Genève, septembre 1978), « International Symposium on Pituitary Microadenomas » (Serono Symposium) (Milan, octobre 1978), Colloque Franco-

Israélien sur « Peptides as Messengers in Biology and Medicine » (Tel Aviv, novembre 1978), Colloque I.N.S.E.R.M. sur « Le Développement du Système Nerveux » (Seillac, novembre 1978), Colloque D.G.R.S.T. « Biologie de la Reproduction et du Développement » (Port Bail, février 1979), Colloque sur « Les Glycoconjugués Membranaires » (Seillac, avril 1977), Réunion annuelle de la « European Tissue Culture Society » (Bratislava, mai 1979). Enfin, des séminaires ont été donnés dans divers laboratoires ou universités à Paris et aux Etats-Unis (Berkeley, San Francisco, Stanford).

DIPLOMES ET NOMINATIONS

M. J.N. LAVERRIERE a soutenu en septembre 1978 un DEA en « Interactions Moléculaires en Biochimie » et obtenu une allocation de 3^e cycle.

M^{me} C. TOUGARD a été nommée Chargée de Recherche au C.N.R.S.

PUBLICATIONS

TIXIER-VIDAL A., NEMESKERI A. and FAIVRE-BAUMAN A. (1978), *Primary cultures of dispersed fetal hypothalamic cell. Ultrastructural and functional features of differentiation.* In « *Cell Biology of Hypothalamic Neurosection* » (J.D. Vincent and C. Kordon eds), C.N.R.S., Paris, 777-802.

BRUNET N. and TIXIER-VIDAL A. (1978), *Increased binding of concanavalin A at the cell surface following exposure to thyroliberin.* *Molecular and Cellular Endocrinology*, 11, 169-180.

FAIVRE-BAUMAN A., GROUSELLE D., NEMESKERI A. and TIXIER-VIDAL A. (1978), *Ontogenesis of thyroliberin in the mouse hypothalamus.* *Brain Research*, 154, 382-387.

BAUER A., GRAF K.J., FAIVRE-BAUMAN A., BEIER S., TIXIER-VIDAL A. and KLEINHAUF H. (1978), *Inhibition of prolactin secretion by histidyl-proline diketopiperazine.* *Nature*, 274, 174-175.

DE VITRY F. (1978), *SV40 transformed hypothalamic cell lines.* In « *Cell Biology of Hypothalamic Neurosection* » (J.D. Vincent and C. Kordon, eds), C.N.R.S., Paris, 47, 808-818.

TIXIER-VIDAL A. and PICART R. (1978), *Ultrastructural data on early developmental stages of mouse fetal hypothalamus*. *Neurosciences Letters*, suppl. 1, S 44, Abs of the IId European Neuroscience Meeting.

DUFY B., VINCENT J.D., FLEURY H., DU PASQUIER P., GOURDJI D. and TIXIER-VIDAL A., *Membrane effects of estrogen on electrical activity as revealed by intracellular recording from cultured pituitary cells*. Accepted pour publication in *Science*.

TIXIER-VIDAL A., BRUNET N. and GOURDJI D. (1979), *Plasma membrane modifications related to the action of TRH on rat prolactin cell lines*. *Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation Series*, chapitre 56, vol. 6.