

Physiologie cellulaire

M. François MOREL, professeur

Le cours n'a pas eu lieu cette année.

SÉMINAIRES

5 séances de séminaires d'une durée de 2 heures portant sur des problèmes récents d'Endocrinologie moléculaire ont été organisés selon le programme suivant :

Mardi 26 février :

D. BATAILLE et coll. : Récepteurs aux peptides de la famille glucagon, secrétine, VIP : le problème des récepteurs communs.

M. GARBARG et coll. : Caractérisation et localisation des récepteurs cérébraux de l'histamine liés à l'AMP cyclique.

J.P. DAUSSE, P. GUICHENET et coll. : Etude biochimique des récepteurs α adrénergiques dans le système nerveux central et périphérique.

M.F. VESIN, LIEN DO KHAC et coll. : La prostacycline : modulateur endogène du taux d'AMPc dans le myomètre de ratte.

Mardi 4 mars :

G. GUILLON et coll. : Taille des récepteurs vasopressiques du foie et du rein de rat.

O. COURAUD et coll. : Anticorps antirécepteurs β adrénergiques.

O. DURIEU, C. KLUTCKO et coll. : Purification et visualisation du récepteur β adrénergique.

G. GUELLAEN et coll. : Solubilisation du récepteur α adrénergique de foie de rat après marquage à la phénoxybenzamine tritiée.

Mardi 11 mars :

M.E. OBLIN, M. CLAIRE et coll. : Facteurs régulant les récepteurs minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes dans le rein du rat.

L.M. HOUDBINE, J. DJIANE et coll. : Régulation négative des récepteurs à la prolactine dans la glande mammaire et le foie ; son rôle éventuel dans le mécanisme d'action de cette hormone.

F. HAOUR et coll. : Mécanisme de la stimulation et de la désensibilisation par l'HCG.

V. HOMBURGER et coll. : Etude de la désensibilisation des récepteurs β adrénergiques dans les cellules gliales C6.

Mardi 18 mars :

J. MESTER, M.G. CATELLI et coll. : Interactions des œstrogènes, de la progestérone et d'un antiœstrogène dans la synthèse de protéines spécifiques dans l'oviducte de poule.

A. MORIN et coll. : Effets transcriptionnels et post-transcriptionnels de la thyrolibérine sur les cellules à prolactine du rat.

A. DOZARD et coll. : Rôle de l'ACTH dans la synthèse protéique surrénalienne.

E. BEAULIEU : Le contrôle de la méiose par l'AMP cyclique.

Mardi 25 mars :

M^{me} CORREZE et coll. : Action directe et via le cAMP des hormones thyroïdiennes sur la lipolyse et la lipogenèse.

M. FEHLMAN et coll. : Effets de l'insuline et du glucagon sur le transport des acides aminés par les hépatocytes isolés de rat.

B. ROSSIGNOL et coll. : Régulation cholinergique et adrénergique de la sécrétion des protéines dans les glandes lacrymales et parotides de rat.

J. CHEVALIER et coll. : Contrôle hormonal de la perméabilité à l'eau de la vessie de grenouille. Analyse physiologique et morphologique.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

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

a) *Sites d'action des hormones dans le rein*

Les recherches concernant la distribution des sites d'action de certaines hormones le long des néphrons se fondent sur la mise en évidence d'une

stimulation de l'adénylate-cyclase dans des segments tubulaires isolés par micro-dissection.

Les effets du glucagon ont été recherchés chez le lapin et le rat. Chez le lapin, le glucagon a produit une action, d'ailleurs faible et inconstante, sur une structure tubulaire seulement, la branche large ascendante des anses de Henle. Chez le rat au contraire, le glucagon stimule de façon intense et reproductible l'adénylate-cyclase dans plusieurs segments : les portions médullaire et corticale de la branche large ascendante des anses, le tube contourné distal (du moins sa portion accessible à la microdissection) et — à un moindre degré — les portions corticale et médullaire du tubule collecteur. Les courbes dose-réponse établies pour le glucagon sur ces segments du néphron de rat indiquent une sensibilité comparable à celle décrite pour l'adénylate-cyclase des membranes du foie chez le rat.

Nous avons observé précédemment que l'adénylate-cyclase de la branche large ascendante est stimulée, en plus du glucagon, par la vasopressine et la calcitonine dans sa portion médullaire et par l'hormone parathyroïdienne, la calcitonine, la vasopressine et l'isoproterenol dans sa portion corticale. Or, on sait que chacun de ces segments tubulaires ne comporte qu'un seul type cellulaire selon les critères morphologiques. La question se posait donc de savoir si les diverses hormones activant l'enzyme d'un même segment agissent toutes sur les mêmes cellules (dont les membranes porteraient tous les récepteurs correspondants) ou s'il existe une spécificité de réponse des cellules, chacune reconnaissant, par exemple, une seule de ces hormones. Des expériences recherchant l'additivité des effets de plusieurs hormones ont été réalisées pour aborder ce problème. Les résultats montrent que les effets de la vasopressine et du glucagon sur la portion médullaire, de l'hormone parathyroïdienne, de la calcitonine et du glucagon sur la portion corticale, ne sont pas additifs lorsque ces hormones sont simultanément présentes dans le milieu. On en déduit qu'un seul et même « pool » d'enzyme agit comme facteur limitant la vitesse de la réaction pour toutes les hormones, et, par conséquent, que les récepteurs moléculaires de ces différentes hormones sont couplés aux mêmes unités catalytiques et donc présents sur les mêmes cellules.

b) *Etudes sur des tubules en survie in vitro*

Des expériences préliminaires ont été entreprises en vue de rechercher les conditions optimales dans lesquelles des tubules isolés par microdissection sur des reins traités par la collagénase pourraient être maintenus en survie *in vitro* suffisamment longtemps pour étudier sur eux divers problèmes biochimiques et métaboliques. Ces expériences préliminaires ont établi qu'il était possible et assez simple de mesurer par périodes successives la production métabolique

de $^{14}\text{CO}_2$ à partir de divers substrats métaboliques marqués sur des échantillons contenant un seul fragment tubulaire (environ 100 ng de protéines totales, volume des échantillons, 1 à 2 μl). Mais les durées de survie obtenues sont encore trop courtes et variables. Il importe maintenant d'améliorer les conditions de survie choisies.

D'autre part, des essais encourageants montrent qu'il est possible de mesurer l'AMP cyclique accumulé dans les cellules d'un fragment tubulaire unique en survie, en réponse à un stimulus hormonal. Ici la méthode utilisée est le dosage radioimmunologique.

c) *ATPase Na-K dépendante*

Après avoir établi le « profil » quantitatif des activités ATPasiques totale et [Na-K] dépendante le long des néphrons (voir nos rapports d'activité des deux années précédentes), il importait de rechercher s'il est possible de faire varier sélectivement l'activité [Na-K] dépendante de certains segments tubulaires lorsque les animaux sont placés dans des conditions appropriées. A. KATZ et A. DOUCET ont testé les effets d'un régime enrichi en potassium et observé, chez les souris ainsi traitées, une augmentation significative (supérieure à un facteur 2) touchant la seule activité ATPasique [Na-K] dépendante (et non la [Mg] - ATPase) dans les tubules collecteurs corticaux. Le déterminisme de cette réponse adaptative n'est pas connu. Ces résultats démontrent, cependant, que le tubule collecteur cortical est impliqué dans l'excrétion tubulaire accrue de potassium existant chez ces souris.

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

Deux directions principales ont été suivies cette année : 1) nous avons prolongé nos études sur les récepteurs aux neuromédiateurs dans le système nerveux central ; 2) nous avons mis au point la culture primaire de cellules gliales à partir du système nerveux de souris nouveau-nées.

a) *Le récepteur à l'adénosine du système nerveux*

Dans notre précédent rapport, nous avons décrit en détail les caractéristiques du récepteur à l'adénosine du système nerveux central et analysé son mode de couplage avec l'adényl-cyclase. Nous avons montré cette année que l'adényl-cyclase du cerveau (comme d'ailleurs toutes les adényl-cyclases étudiées jusqu'à ce jour) possède également un site de reconnaissance de l'adénosine inhibiteur de l'adényl-cyclase. La stéréospécificité du site inhibiteur est différente de celle du site activateur. Par exemple, les dérivés substitués

en position 6 du noyau purine sont de bons agonistes du récepteur activateur et n'ont pas d'affinité pour le site inhibiteur. L'inhibition est le résultat d'un mécanisme biréactionnel entre le site adénosine inhibiteur et un site ayant une haute affinité pour le Mg^{++} ($K_m = 2 \times 10^{-4}M$).

Le site activateur est caractérisé par : 1) sa localisation limitée à certaines régions du cerveau seulement ; 2) son couplage à une protéine liant le GTP ; 3) sa présence sur une protéine différente de l'unité catalytique de l'adényl-cyclase.

Le site inhibiteur au contraire est caractérisé par : 1) sa localisation dans toutes les régions cérébrales ; 2) son absence d'exigences de GTP pour inhiber l'activité de l'enzyme ; 3) sa présence sur l'unité catalytique de l'enzyme.

Le rôle physiologique du site inhibiteur reste à déterminer.

b) Le récepteur à la dopamine couplé à une adényl-cyclase du noyau caudé de rat

Nous avons envisagé de répondre à deux questions qui se posent à propos de ce récepteur :

a) Ce récepteur est-il impliqué dans l'activité des neurones cholinergiques du noyau caudé ? La question est intéressante à deux points de vue : d'abord parce que l'on ne sait pas exactement sur quel type de neurone le récepteur se trouve ; ensuite parce que l'on ne connaît presque rien du rôle de l'AMP cyclique produit dans le noyau caudé sous l'influence de la dopamine.

L'apomorphine et certains dérivés N-diphénéthylamines de synthèse augmentent le contenu du noyau caudé en acétyl-choline, alors que seule l'apomorphine augmente son contenu en AMP cyclique. Le D-LSD, qui stimule l'adényl-cyclase, ne modifie pas le contenu en acétyl-choline. La methergoline et l'haloperidol inhibent tous les deux l'adényl-cyclase stimulée par la dopamine, alors que seul l'haloperidol abaisse le contenu en acétyl-choline. De plus, l'injection de toxine cholérique augmente beaucoup le contenu en AMP cyclique et ne modifie pas le contenu en acétyl-choline. Ces résultats excluent donc que le récepteur à la dopamine couplé à une adényl-cyclase soit localisé sur les neurones cholinergiques.

b) Y a-t-il une relation quelconque entre le récepteur à la dopamine du noyau caudé et le récepteur mis en évidence avec les neuroleptiques radioactifs ?

Bien que de nombreux arguments fassent penser que ces deux récepteurs dopaminergiques sont distincts, certains auteurs estiment qu'une relation existe entre eux. L'argumentation de ces auteurs est fondée sur plusieurs observa-

tions : 1) le GTP, qui est indispensable à l'activation de l'adenyl-cyclase par la dopamine, réduit aussi l'affinité de la dopamine pour le récepteur aux neuroleptiques, mais pas celle de la bromocriptine (ce composé n'active pas l'adenyl-cyclase) ; 2) lorsque l'adenyl-cyclase est détruite par l'acide kaïnique, le GTP n'a plus d'effet sur les sites neuroleptiques restant. Pour analyser ce problème plus en détail, nous avons bloqué irréversiblement les sites aux neuroleptiques et mesuré l'activité de l'adenyl-cyclase sensible à la dopamine et son inhibition par les neuroleptiques. Le blocage irréversible a été réalisé par la phenoxybenzamine. Lorsque tous les sites marqués par les neuroleptiques sont bloqués, on conserve 65 % de la stimulation adenylyl cyclasique par la dopamine. De plus, l'affinité des neuroleptiques en tant qu'inhibiteurs de cette stimulation est inchangée. Il est donc clair que les deux récepteurs dopaminergiques — ceux couplés à l'adenyl-cyclase et ceux marqués par les neuroleptiques — sont différents.

3) *Le récepteur β adrénergique couplé à une adenylyl-cyclase du système nerveux central.*

Nous avons précédemment montré que le récepteur β adrénergique du système nerveux central est couplé à une adenylyl-cyclase.

Cette année, nous avons caractérisé le type de récepteur β adrénergique impliqué. S'agissait-il d'un récepteur β_1 adrénergique comme dans le cœur ou β_2 adrénergique comme dans les poumons ? En fait, les deux récepteurs existent, mais ils sont localisés dans des régions différentes du système nerveux. Alors que les récepteurs β_1 adrénergiques sont situés dans le cortex et l'hippocampe, le récepteur β_2 est situé dans le cervelet. Il est intéressant de noter que seul le cervelet est innervé par des fibres adrénergiques chez les mammifères. Dans le cerveau des amphibiens, l'adrénaline seule est présente, alors que dans celui des oiseaux, on trouve l'adrénaline comme la nor-adrénaline. Il est possible que les récepteurs de type β_2 aient été remplacés par des récepteurs β_1 au cours de l'évolution, en parallèle avec la substitution de l'adrénaline par la nor-adrénaline dans les terminaisons nerveuses.

Par ailleurs, nous avons mis au point une méthode permettant d'obtenir des cellules gliales en culture primaire. Les cultures obtenues sont composées d'au moins 95 % de cellules gliales. Ceci a été vérifié par la présence, sur ces cellules, des antigènes spécifiques des cellules gliales : la GFA (glial fibrillary acidic protein) et la protéine S 100.

EQUIPE D'ENDOCRINOLOGIE MOLÉCULAIRE

(S. JARD, D. BUTLEN, B. CANTAU, G. GUILLON, J. PENIT,
R. RAJERISON, C. ROY)

Les travaux de l'année écoulée ont été essentiellement consacrés à l'étude des récepteurs extrarénaux de la vasopressine. La caractérisation des récepteurs hépatiques de la vasopressine (cf. résultats rapportés antérieurement) a été complétée par la recherche des conditions ou facteurs modulant l'interaction hormone-récepteur. Trois observations principales ont été effectuées : 1) Le GTP diminue l'affinité apparente du récepteur pour l'hormone en augmentant la constante de vitesse de la réaction de dissociation du complexe hormone-récepteur. Cette action est très comparable à l'action du GTP décrite sur de nombreux récepteurs couplés à l'adénylate cyclase membranaire (rappelons que la vasopressine exerce son action glycogénolytique sur le foie par des mécanismes indépendants de l'AMP cyclique). Elle s'exerce vis-à-vis de la vasopressine et des analogues de l'hormone doués d'un pouvoir glycogénolytique, mais non vis-à-vis des inhibiteurs compétitifs de la vasopressine. Par analogie avec les données acquises sur les systèmes adényl-cyclasiques, cette observation laisse supposer que le GTP est impliqué dans le couplage fonctionnel entre récepteur et effecteur ; 2) les ions magnésium sont indispensables à la liaison de la vasopressine sur ses récepteurs hépatiques. Le traitement des membranes de foie par des chélateurs du magnésium supprime leur aptitude à fixer spécifiquement la vasopressine. Une capacité normale de fixation est restaurée par l'addition d'ions magnésium. Le manganèse peut se substituer au magnésium, le calcium est inhibiteur de la fixation ; 3) Les anions monovalents ($F > I > Br > SCN \geq Cl$) produisent un « masquage » réversible des récepteurs de la vasopressine, mais non des récepteurs du glucagon. Ces effets se distinguent clairement des effets ioniques décrits pour d'autres récepteurs.

Si l'on peut considérer comme démontré que l'AMP cyclique n'est pas le médiateur intracellulaire de l'action glycogénolytique de la vasopressine sur le foie, il est difficile pour autant d'exclure l'existence de toute relation fonctionnelle entre le récepteur hépatique de la vasopressine et l'adénylate cyclase membranaire. Il a été montré d'une part, que l'occupation des récepteurs alpha-adrénergiques et des récepteurs des opiacés par leurs ligands respectifs entraînent dans plusieurs systèmes (plaquettes, adipocytes, système nerveux central) une inhibition de l'adénylate cyclase membranaire ; d'autre part, agonistes alpha-adrénergiques, vasopressine et angiotensine stimulent la glycogénolyse hépatique par des mécanismes semblables (dans les trois cas, l'activation de la phosphorylase résulte d'une augmentation de la concentration du calcium ionisé cytosolique). Il apparaissait donc opportun de recher-

cher une inhibition éventuelle de l'adénylate cyclase hépatique par la vasopressine et à titre de comparaison par les agonistes alpha-adrénergiques et l'angiotensine. Les expériences réalisées ont montré que les agonistes alpha-adrénergiques, et l'angiotensine, mais non la vasopressine, inhibent l'adénylate cyclase hépatique. L'inhibition ne se manifeste qu'en présence de GTP et d'un cation monovalent ($\text{Li}^+ >$, $\text{Na}^+ >$ K^+).

Des études antérieures effectuées sur le récepteur rénal de la vasopressine avaient montré l'existence de modifications du nombre des récepteurs de l'hormone dans un ensemble de situations physiologiques ou physiopathologiques s'accompagnant de modifications de la concentration de vasopressine circulante. Dans aucune de ces situations il n'a été possible de mettre en évidence des modifications parallèles du nombre des récepteurs hépatiques. Il est frappant par exemple de constater que le récepteur hépatique n'est pas l'objet comme l'est le récepteur rénal d'une « down-regulation », c'est-à-dire une disparition partielle des récepteurs en réponse à l'administration *in vivo* de doses élevées de vasopressine.

Les travaux préparatoires à la caractérisation du récepteur vasculaire de la vasopressine ont été réalisés. Ainsi, les techniques permettant d'isoler et de maintenir en culture primaire des myocytes de la paroi aortique du rat et des cellules mésangiales du glomérule rénal ont été introduites au laboratoire. Il est d'ores et déjà acquis que ces cellules répondent par une contraction à une stimulation par la vasopressine et que des sites de fixation spécifique de l'hormone peuvent être détectés.

Les études sur le récepteur rénal de la vasopressine ont porté d'une part sur des clones de cellules rénales sensibles à la vasopressine et d'autre part sur l'adénylate cyclase solubilisée de membranes préparées à partir des régions profondes du rein. Le travail sur les cellules rénales en culture est un prolongement du travail réalisé par M. Christian ROY, au cours d'un stage récent aux Etats-Unis. Une attention particulière a été portée sur les mécanismes de la désensibilisation (perte partielle de la stimulation de l'adénylate cyclase) observée lors d'une exposition chronique des cellules intactes à la vasopressine. Il a été montré en particulier que la désensibilisation peut être bloquée lorsque les cellules sont cultivées en présence d'une concentration élevée de ClNa et qu'elle peut être levée par l'addition de GTP au milieu d'incubation de fractions membranaires préparées à partir de cellules désensibilisées. Sur l'adénylate cyclase rénale solubilisée, il a été montré que l'apparition d'une forme lourde (6,7 S) de l'enzyme n'est pas nécessairement liée, contrairement à ce que laissait supposer une étude antérieure, à une préactivation irréversible de l'enzyme par le Gpp(NH)p . Une transition forme légère-forme lourde peut être induite par le dithiothréitol sans modifications associées de l'activité catalytique de l'enzyme.

MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS SUR INVITATION

M. François MOREL a présenté des exposés sur invitation au XII^e Congrès européen d'Endocrinologie (Munich, juin 1979) et à la Conférence Internationale on Clinical aspects of cyclic nucleotides (Colorado, juillet 1979) ; de plus, il a été invité au III^e Colloque européen de physiologie rénale (Uppsala, juillet 1979), au fifth Symposium on Biochemical aspects of kidney functions (Oxford, septembre 1979) et au fourth european Symposium on hormones and cell regulation (Bischenberg, octobre 1979). En outre, M. François MOREL a prononcé la Homer Smith Award Lecture lors de la réunion annuelle de l'American Society for Nephrology à Boston (novembre 1979). Il a enfin été invité à donner des conférences par le Centre hospitalo-universitaire de Luxembourg (mai 1979), par l'Académie Royale de Médecine de Belgique (Bruxelles, décembre 1980), par la Faculté de Pharmacie de Strasbourg (Journées scientifiques, décembre 1979) et par la Faculté des Sciences de Marrakech (avril 1980).

M^{me} IMBERT-TEBOUL a fait un exposé, en juin 1979, au 7^e Nephrologischen Symposium de Hanover.

M. Joël BOCKAERT a été invité au Congrès « Serotonin-current aspects of Neurochemistry and function » (Athènes, septembre 1979).

M. Christian ROY a effectué du 1^{er} novembre 1978 au 1^{er} août 1979 un stage d'étude dans les laboratoires de D. AUSIELLO (Boston) et J.S. HANDLER (Bethesda) et présenté ses travaux au « 11th annual Meeting of the american Society for Nephrology ».

M. Serge JARD a participé au « 4th international I.N.S.E.R.M. symposium on hormones and cell regulation » (Bischenberg, octobre 1979) ; « international Titisee conference on drug action at the molecular level : differences between agonists and antagonists » (Titisee, octobre 1979) ; « international symposium on the biochemical aspects of kidney function » (Oxford, novembre 1979) ; « Neuropeptides : quo vadis ? » (Montpellier, mai 1980).

DISTINCTIONS, PROMOTIONS ET DIPLOMES

M. François MOREL a reçu, en novembre 1979, le prix Homer Smith, décerné par la « New York Heart Association ».

M. Daniel BUTLEN a soutenu sa thèse de Doctorat d'Etat.

M. Vincent HOMBURGER a soutenu une thèse de Doctorat de 3^e cycle.

PUBLICATIONS

F. MOREL, D. CHABARDES and M. IMBERT-TEBOUL, *Distribution of adenylylase in the nephron* (In *Current Topics in Membranes and Transport*, Ed. F. Bronner a. A. Kleinzeller, Vol. 13, Chap. 29, p. 415-426, Acad. Press, 1980).

A. DOUCET, A.I. KATZ and F. MOREL, with the technical assistance of M. Montegut and A. Clique, *Determination of Na-K-ATPase activity in single segments of the mammalian nephron* (*Am. J. Physiol.*, 237, F 105-113, 1979).

A.I. KATZ, A. DOUCET and F. MOREL, with the technical assistance of M. Montegut and A. Clique, *Na-K-ATPase activity along the rabbit, rat and mouse nephron* (*Am. J. Physiol.*, 237, F. 114-120).

F. MOREL, *Un point de vue de physiologiste expérimentateur* (Dans *Recherches interdisciplinaires, Elaboration et justification des modèles*. Ma-loine S.A. Ed., 1979, T. 1, p. 31-37).

F. MOREL, *La régulation hormonale du fonctionnement rénal* (*Bull. et Mém. Acad. Roy. Méd. Belgique*, 134, N° 10, p. 619-631, 1979).

D. CHABARDES, M. GAGNAN-BRUNETTE, M. IMBERT-TEBOUL, O. GONTCHAROVSKAIA, M. MONTEGUT, A. CLIQUE and F. MOREL, *Adenylylase responsiveness to hormones in various portions of the human nephron* (*J. Clin. Invest.*, 65, 439-448, 1980).

F. MOREL et M. IMBERT-TEBOUL, *Mécanismes de concentration de l'urine par le rein* (Dans *La fonction rénale, acquisitions et perspectives*, Ed. J.P. Bon-valet, I.N.S.E.R.M./Flammarion Médecine, 1980, Chap. 7, p. 125-139).

D. CHABARDES, M. IMBERT-TEBOUL, M. MONTEGUT, A. CLIQUE, A. HUS-CITHAREL et F. MOREL, *Régulation hormonale des fonctions du tubule rénal : action des hormones polypeptidiques et des catécholamines* (Ibid, Chap. 9, p. 157-169).

F. MOREL, *Recherche en physiologie rénale : bilan et perspectives* (Ibid., p. 251-254).

F. MOREL, M. IMBERT-TEBOUL et D. CHABARDES, *Hormonal regulation of adenylylase along the nephron* (XIIth Acta Endocr. Congress, Munich; *Acta Endocr.*, Kbh, 91, Suppl. 225, Abstr. 451, p. 476-477, 1979).

M. IMBERT-TEBOUL, D. CHABARDES and F. MOREL, *Lack of effect of prostaglandins (PGE₁) on vasopressin sensitive adenylylase in rat kidney medulla* (III. Europ Colloq. of Renal Physiol., Upsala, June 17-20, 1979; *Upsala J. Med. Sci.*, Suppl. 26, Abstr. 34).

F. MOREL, D. CHABARDES and M. IMBERT-TEBOUL, *Effects of catecholamines on adenylate cyclase along the rat nephron* (Ibid., Abstr. 53).

A. DOLPHIN, M. HAMON and J. BOCKAERT, *The resolution of dopamine and β_2 -adrenergic-sensitive adenylate cyclase activities in homogenates of cat cerebellum, hippocampus and cerebral cortex* (*Brain Research*, 179, 305-317, 1979).

C. EVRARD, J. PREMONT, C. OBERLANDER, J.R. BOISSIER and J. BOCKAERT, *Is dopamine-sensitive adenylate cyclase involved in regulating the activity of striatal cholinergic neurons?* (*Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacology*, 309, 241-245, 1979).

J. PREMONT, J.P. TASSIN, G. BLANC et J. BOCKAERT, *Effects of adenosine on adenylate cyclase in broken cell preparations of central nervous system* (In *Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides*, Ed. H.B. Baer and G.I. Drummond. Raven Press, New York, p. 259-269, 1976).

C. ROY, *Vasopressin-sensitive adenylate cyclase reversibility of hormonal activation* (*Biochim. Biophys. Acta*, 587, 433-445, 1979).

Y. ZAGYANSKY and S. JARD, *Does lectin-receptor complex formation produce zones of restricted mobility within the membrane?* (*Nature*, 280, 591-593, 1979).

J. PREMONT, G. GUILLON and J. BOCKAERT, *Specific Mg^{2+} and adenosine sites involved in a bireactant mechanism for adenylate cyclase inhibition and their probable localization on this enzyme's catalytic component* (*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 90, 513-519, 1979).

B. CANTAU, S. KEPPENS, H. DE WULFF and S. JARD, *(3H)-vasopressin binding to isolated rat hepatocytes and liver membranes : regulation by GTP and relation to glycogen phosphorylase activation* (*Journal of Receptor Research*, 2, 125-150, 1980).

S. JARD, *Oxytocin and vasopressin receptors* (In *Cellular receptors for hormones and neurotransmitters*. D. Schulster and A. Levitzki eds., John Wiley and Sons Ltd., England).

D.A. AUSIELLO, J.I. KREISBERG, C. ROY and M.J. KARNOVSKY, *contractions of cultured rat glomerular cells of apparent mesangial origin after stimulation with angiotensin II and arginine vasopressin* (*J. Clin. Invest.*, 65, 754-760, 1980).

G. VASSENT, *Un modèle cinétique élémentaire pour l'interprétation de la formation de chaînes de liaison entre ligands bi-valents* (*C. R. Acad. Sci.*, 288, 1485-1488, 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) *Régulation de la sécrétion de prolactine par des lignées de cellules antéhypophysaires en culture. Aspects morphologiques et moléculaires*

Le rôle stimulant du Peptide Intestinal Vasoactif (VIP) sur la sécrétion de prolactine par les cellules de la lignée GH3 a été mis en évidence pour la première fois. Cet effet est au moins aussi puissant que celui exercé par le peptide hypothalamique TRH. De plus, on a montré que le VIP stimule parallèlement la production de AMPc par les cellules GH3, alors que le TRH n'a qu'un effet très discret sur ce nucléotide. Le traitement simultané par les deux peptides exerce un effet additif sur la sécrétion de prolactine, la production de AMPc étant inchangée par rapport à l'effet du VIP seul. La présence du VIP dans des neurones hypothalamiques, ainsi que dans le système porte hypophysaire, permet de conclure que cet effet du VIP a une signification physiologique (GOURDI et al., 1979).

Les mécanismes de l'interaction exercée par l'estradiol 17 β sur la réponse des cellules GH3 au TRH ont été analysés au moyen de cultures pratiquées sur des milieux déplétés en stéroïdes par traitement des sérums au charbon dextran, supplémentés ou non en estradiol 17 β (« CD », « CDE »). On montre ainsi que le prétraitement par l'estradiol 17 β (10^{-8} M) augmente de 50 % le nombre des sites récepteurs du 3 H-TRH sans augmenter leur affinité, accroît de 300 % l'amplitude de la libération de prolactine en réponse au TRH et améliore d'un ordre de grandeur la dose de TRH produisant 50 % de l'effet biologique maximum (ED 50). L'estradiol 17 β intervient donc simultanément à plusieurs étapes de la réponse des cellules GH3 au TRH (BRUNET et al., 1980).

Dans le cadre des recherches sur le mécanisme du rôle stimulant exercé par le TRH sur la synthèse de prolactine par les cellules GH3, on a montré que dans les conditions de stimulation optimale de la synthèse de prolactine (traitement pendant 48 heures), le TRH diminue le taux de synthèse des ARN cytoplasmiques totaux au profit de celle des ARN messagers poly(A). En outre, parmi ceux-ci, il stimule préférentiellement, de 10 à 15 fois, la synthèse du pic d'ARNm poly(A) de densité 11-13 S correspondant au message de la prolactine. Des expériences de chasse montrent que le TRH stabilise cette espèce d'ARNm poly(A) dont la demi-vie passe de 10 à 23-25 heures (A. MORIN, 1979). Des expériences récentes en système acellulaire confirment

que le pic 11-13 S code pour la synthèse de pré-prolactine et que l'activité codante est accrue par le TRH.

Dans le cadre des recherches conduites depuis plusieurs années sur les mécanismes et le rôle de l'« internalisation » du TRH dans ses cellules cibles, on a recherché l'effet d'un agent lysosomotrope, inhibiteur des hydrolases lysosomales, la chloroquine. On a montré que cette drogue, employée à dose non toxique, n'interfère pas dans la liaison du TRH et la réponse biologique rapide au TRH, mais ralentit la décharge du ^3H -TRH préalablement lié, celui-ci étant retenu au niveau cytoplasmique. Ceci suggère qu'une partie au moins du TRH internalisé est liée à un « récepteur » dont la dégradation serait inhibée par la chloroquine (TIXIER-VIDAL et al., 1979).

Enfin, les recherches sur l'activité électrique des cellules GH3, entreprises en collaboration avec B. DUFY et J.D. VINCENT (Unité de Neurophysiologie, I.N.S.E.R.M., Bordeaux), se sont poursuivies. Il a été montré notamment que la dopamine, agent inhibiteur de la sécrétion de prolactine, inhibe non seulement l'activité spontanée des cellules GH3, mais également les potentiels d'action induits par le TRH. De plus, ces effets de la dopamine sont inhibés par le prétraitement des cellules par l'estradiol 17 β . Dans l'ensemble, ces effets électriques sont en étroite corrélation avec la réponse biologique globale mesurée sur la libération de prolactine (DUFY et al., 1979).

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

La caractérisation de certaines des lignées hypothalamiques obtenues par transformation virale (SV 40) de cultures primaires, qui a fait l'objet des recherches de plusieurs années (cf. revue TIXIER-VIDAL et DE VITRY, 1979), s'est poursuivie. C'est ainsi que la présence de somatostatine a été détectée immunocytochimiquement de façon spécifique dans un clone de cellules hypothalamiques (F7) présentant par ailleurs les propriétés de cellules nerveuses primitives, mais capables, après passage *in vivo*, d'acquérir une immunoréactivité de type neurophysine. Par contre, une autre lignée (D7), plus différenciée et capable *in vitro* de synthétiser neurophysine et vasopressine, ne donne qu'une réaction très faible avec le sérum anti-somatostatine. Ces faits sont à rapprocher de la présence d'une immunoréactivité de type somatostatine dans les cellules subépendymaires du III^e ventricule chez le fœtus de porc (DUBOIS, 1977). Ils suggèrent que la lignée F7 possède les propriétés d'une cellule nerveuse précurseur et que l'antigénicité de type somatostatine représenterait une étape transitoire dans l'évolution conduisant à un type de neurone peptidergique différencié (DE VITRY et al., 1979). Par ailleurs, dans le cours de recherches effectuées avec K. BAUER (Berlin W), en vue d'identifier chimiquement des peptides synthétisés par plusieurs lignées hypothalamiques

SV 40 et par la lignée gliale C6 utilisée comme témoin, il a été trouvé de façon inattendue que la lignée C6 synthétise plusieurs neurotransmetteurs putatifs, également présents dans le cerveau, mais absents dans nos lignées hypothalamiques, notamment la carnosine (N-(β -alanyl)histidine) et l'homocarnosine (N $^{\alpha}$ -(γ -aminobutyryl)histidine) (BAUER et al., 1979).

L'étude expérimentale de l'ontogénèse du tripeptide hypothalamique TRH chez la souris s'est poursuivie. Dans des cultures primaires de cellules nerveuses fœtales provenant soit de l'hypothalamus, soit des hémisphères cérébraux et prélevées à deux stades critiques de l'ontogénèse *in vivo* du TRH (13^e j. - 16^e j.), on a détecté, par dosage radioimmunologique après extraction tissulaire et par immunocytochimie, des neurones contenant un matériel de type TRH. Du point de vue quantitatif, l'activité TRH se maintient *in vitro* à son niveau initial dans les deux structures, mais n'augmente pas, sauf dans le cas des cellules des hémisphères cérébraux prélevées chez l'embryon au 13^e jour. En outre, l'ultrastructure des neurones à TRH a été décrite pour la première fois par immunocytochimie ultrastructurale. La localisation polyribosomale de la réaction suggère la synthèse d'un précurseur immunoréactif de type protéique. Dans le but d'analyser le rôle des facteurs hormonaux impliqués dans la différenciation des neurones à TRH, il devenait nécessaire de contrôler de façon précise la composition du milieu de culture et donc d'éliminer de celui-ci le sérum de veau fœtal. Un milieu sans sérum a donc été mis au point permettant la culture de ces mêmes cellules fœtales. Plusieurs activités neuronales ont été mesurées au cours du développement *in vitro* de la culture : TRH, tyrosine hydroxylase et acétylcholine estérase. Seule, cette dernière activité augmente au même rythme en culture et *in vivo* (FAIVRE-BAUMAN et al., 1980). L'étude du rôle modulateur des hormones thyroïdiennes sur le développement de ces activités neuronales est en cours.

PUBLICATIONS

A. TIXIER-VIDAL and F. DE VITRY, *Hypothalamic neurons in cell culture* (*Intern. Rev. Cytol.*, 58, 291-331, 1979).

A. TIXIER-VIDAL, N. BRUNET, C. TOUGARD and D. GOURDJI, *Morphological and molecular aspects of prolactin and growth hormone secretion by normal and tumoral pituitary cells in culture* (In *Pituitary Microadenomas*, G. Faglia, M.A. Giovanelli and R.M. Macleod eds, Proceedings of the Serono Symposia, Academic Press, vol. 29, 73-90, 1980).

F. DE VITRY, M. DUBOIS and A. TIXIER-VIDAL, *Immunological detection of somatostatin in a primitive hypothalamic mouse cell line, precursor of neurophysin cell lineage* (*J. Physiol.*, 75, 11-13, 1979).

K. BAUER, J. SALNIKOW, F. DE VITRY, A. TIXIER-VIDAL and H. KLEIN-KAUF, *Characterization and biosynthesis of co-Aminoacyl Amino Acids from rat brain and the C6 glioma cell line* (*J. Biol. Chem.*, 254, 6402-6407, 1979).

D. GOURDJI, D. BATAILLE, N. VAUCLIN, D. GROUSELLE, G. ROSSELIN and A. TIXIER-VIDAL, *Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) stimulates prolactin (PRL) release and cAMP production in a rat pituitary cell line (GH3/B6). Additive effects of VIP and TRH on PRL release* (*FEBS Letters*, 104, 165-168, 1979).

D. BATAILLE, D. GOURDJI, M. MALETTI, N. VAUCLIN, D. GROUSELLE, A. TIXIER-VIDAL and G. ROSSELIN, *Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) : concomittant stimulation of prolactin release and cyclic AMP production in a rat anterior pituitary cell line (GH3/B6). Comparison with thyroliberin (TRH)* (In *Hormone Receptors in Digestion and Nutrition*, G. Rosselin, P. Fromageot and S. Bonfils, eds, Elsevier North Holland, pp. 465-473, 1979).

A. TIXIER-VIDAL, *Structural Basis of Adenohypophyseal Secretory Processes* (In *Synthesis and Release of Adenohypophyseal Hormones*, M. Jutisz and Mc Kerns, eds, Plenum Publ. Corp., 1-13, 1980).

C. TOUGARD, *Immunocytochemical identification of LH and FSH secreting cells at the light and electron microscope levels* (In *Synthesis and Release of Adenohypophyseal Hormones*, M. Jutisz and Mc Kerns, eds, Plenum Publ. Corp., 15-37, 1980).

D. GOURDJI, *Characterization of Thyroliberin (TRH) Binding Sites and Coupling with Prolactin and Growth Hormone Secretion in Rat Pituitary Cell lines* (In *Synthesis and Release of Adenohypophyseal Hormones*, M. Jutisz and Mc Kerns, eds, Plenum Publ. Corp., 463-493, 1980).

A. MORIN, *Effect of Thyroliberin on the Synthesis and Stability of Cytoplasmic mRNA of GH3/B6 Cells* (In *Synthesis and Release of Adenohypophyseal Hormones*, M. Jutisz and Mc Kerns, eds, Plenum Publ. Corp., 285-294, 1980).

A. FAIVRE-BAUMAN, A. NEMESKERI, C. TOUGARD and A. TIXIER-VIDAL, *Immunological evidence for thyroliberin (TRH) neurons in primary cultures of fetal mouse brain cells. Ontogenic aspects* (*Brain Research*, 185, 289-304, 1980).

C. TOUGARD, A. TIXIER-VIDAL and S. AVRAMEAS, *Comparison between peroxidase-conjugated antigen or antibody and peroxidase-anti-peroxidase complex in a postembedding procedure* (*J. Histochem. and Cytochem.*, 27, n° 12, 1630-1633, 1979).

C. TOUGARD, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL, *Immunocytochemical localization of glycoprotein hormones in the rat anterior pituitary* (*J. Histochem. and Cytochem.*, 28, n° 2, 101-114, 1980).

A. TIXIER-VIDAL, M.F. MOREAU, R. PICART and D. GOURDJI, *Endocytosis and lysosomes in cultured prolactin cells under stimulation by thyroliberin* (*Biologie Cellulaire*, 36, 167-174, 1979).

A. TIXIER-VIDAL and D. GOURDJI, *Endocytosis in cultured prolactin cells* (In *Central and Peripheral Regulation of Prolactin Function*, Macleod and Scapagnini, eds, Raven Press, New York, 125-140, 1980).

B. DUFY, J.D. VINCENT, H. FLEURY, P. DU PASQUIER, D. GOURDJI and A. TIXIER-VIDAL, *Dopamine inhibition of action potentials in a prolactin secreting cell line is modulated by oestrogen* (*Nature*, 282, 855-857, 1979).

N. BRUNET, D. GOURDJI and A. TIXIER-VIDAL, *Effect of 17 β -estradiol on Thyroliberin Responsiveness in GH3/B6 Rat Prolactin Cells* (*Mol. and Cell. Endocrinol.*, 18, n° 2, 123-136, 1980).

A. FAIVRE-BAUMAN, E. ROSENBAUM, J. PUYMIRAT et A. TIXIER-VIDAL, *Mise en évidence d'activités neuronales dans des cultures primaires d'hypothalamus de Souris fœtales maintenues en milieu sans sérum* (*C. R. Acad. Sci.*, Paris, 290, Série D, 885-887, 31 mars 1980).

MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS

M^{me} TIXIER-VIDAL et/ou certains de ses collaborateurs ont participé aux réunions suivantes : Round Table on « Lysosomes in Endocrine Secretion », Marseille, 21-22 juin 1979 ; Réunion annuelle de la Société Française de Microscopie Electronique, Symposium « Immunocytochimie et ses limites », Lyon, 21-23 mai 1979 ; International Workshop on Cell Lineages, Stem Cells and Determination, Seillac, mai 1979 ; Réunion annuelle de la Société Française de Neuroendocrinologie Expérimentale, Symposium « Récepteurs Hormonaux », Lyon, septembre 1979 ; First International Congress on Hormones and Cancer, Rome, octobre 1979 ; Réunion annuelle du Cercle de Biologie Cellulaire, Paris, septembre 1979 ; International Symposium on Central and Peripheral Regulation of Prolactin Function, Taormina, octobre 1979.

Enfin, des cours ou séminaires ont été donnés dans divers laboratoires ou universités à Paris et à Bordeaux.

M^{me} DE VITRY a été nommée Maître de Recherche au C.N.R.S.