

## Physiologie cellulaire

M. François MOREL, professeur

### INTRODUCTION

Le titre du cours annoncé cette année indiquait « biochimie et physiologie du tubule rénal isolé ». Il n'a été possible d'en traiter qu'une partie, et nous nous proposons de poursuivre l'année prochaine.

La mise au point, il y a environ 15 ans, de microméthodes qui permettent l'étude physiologique et biochimique de segments tubulaires en survie *in vitro* a eu pour conséquence de changer assez profondément la nature même des problèmes qu'il devenait possible d'aborder. En effet, toute étude effectuée *in vivo* sur le rein en place — qu'il s'agisse d'expériences intéressant l'organe entier, ou d'expériences de microponctions tubulaires intéressant des néphrons individuels — est limitée dans son interprétation par l'hétérogénéité anatomique de l'organe et de ses néphrons. En effet, les types cellulaires qui constituent les parois des tubules rénaux sont différents, morphologiquement et fonctionnellement, d'un segment tubulaire à l'autre. Ce n'est qu'en séparant les différents segments les uns des autres et en analysant les fonctions propres à chacun d'entre eux qu'il deviendra possible de comprendre les contributions spécifiques apportées par chaque segment tubulaire à l'élaboration de l'urine. Cette approche est devenue possible grâce à la méthode de microperfusion *in vitro* de segments tubulaires isolés par microdissection.

Mais de telles études *in vitro* sont réalisées dans des conditions hautement artificielles et comportent leurs propres limitations. Il importe donc d'établir si des tubules perfusés *in vitro* conservent qualitativement et quantitativement des propriétés identiques à celles qui prévalent *in vivo* quand ces tubules sont placés dans leur environnement physiologique normal. A cet égard, le tubule contourné proximal s'avère une structure favorable en raison du fait qu'il représente le constituant majoritaire (environ 80 pour cent) du cortex rénal total. Les suspensions de tubules obtenues après traitement de tissu cortical par la collagénase contiennent donc en grande majorité des tubules proximaux. De telles suspensions comportent assez de cellules pour permettre

la mise en œuvre des techniques biochimiques habituelles, et elles permettent dès lors des comparaisons : d'une part avec les mesures effectuées *in vivo* sur le cortex rénal intact ; d'autre part avec les résultats obtenus sur des segments individuels de tubules proximaux grâce aux microméthodes les plus sensibles.

La première partie du cours, celle de cette année, a été consacrée à l'analyse des propriétés métaboliques et des fonctions de transport du tubule proximal, ainsi qu'à la discussion de la validité des méthodes mises en œuvre.

### *TRANSPORT TRANSCELLULAIRE DE L'EAU ET RÉGULATION DU VOLUME CELLULAIRE*

La régulation du volume cellulaire pose des problèmes spécifiques dans le cas des cellules épithéliales absorbantes telles les cellules tubulaires proximales du rein, puisque ces cellules sont continuellement traversées par un flux net important d'eau et de solutés, dirigé de leur face apicale (lumière tubulaire) vers leur face basale (milieu intérieur). Comme les membranes plasmiques apicales et basales de ces cellules sont hautement perméables à l'eau, l'égalité de pression osmotique est continuellement maintenue entre milieux intratubulaire, intracellulaire et pérítubulaire. C'est le transport actif de sodium dans les membranes basolatérales qui conditionne la plus grande partie des transferts de solutés et d'eau, soit directement, soit par l'intermédiaire des gradients électrochimiques qui en résultent. On sait maintenant que des mécanismes passifs ou d'autres électrolytes, permettent le couplage entre flux de ces substrats et flux de sodium ; du côté apical, la pénétration dans la cellule des ions sodium le long de leur gradient électrochimique permet, par ce mécanisme de couplage, l'accumulation intracellulaire simultanée de ces substrats. Sur l'autre face cellulaire, les ions  $\text{Na}^+$  sont expulsés vers l'extérieur par transport actif (Na-K-ATPase). L'asymétrie et la polarité fonctionnelle des cellules tubulaires, les propriétés de perméabilité différente de leurs deux faces, permettent l'établissement de tous les flux spécifiques de réabsorption. Le maintien de la constance du volume cellulaire implique que la balance des flux nets de solutés à chacune des faces cellulaires soit à tout instant exactement équilibrée.

Les rôles respectifs de la Na-K-ATPase basolatérale et d'autres mécanismes éventuels de transport actif d'ions dans la régulation du volume cellulaire ont été analysés sur le tubule proximal en survie *in vitro* en recherchant les effets sur le diamètre tubulaire produits par des substitutions ioniques appropriées, des chocs osmotiques, des variations de température ou encore, des inhibiteurs spécifiques. Les résultats correspondants ont été analysés et

discutés au cours, notamment ceux suggérant l'existence d'une  $\text{Na}^+$ -ATPase de transport non inhibée par l'ouabaine, et spécifiquement impliquée dans l'expulsion d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . Il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'argument formel prouvant la présence d'une telle pompe ionique dans le tubule proximal. Par contre, l'élasticité de la membrane pérیتubulaire semble un facteur d'appoint important dans la régulation du volume cellulaire, puisqu'après hydrolyse de cette membrane par la collagénase, l'application d'ouabaine entraîne un gonflement tubulaire irréversible qu'on n'observe pas en présence de cette membrane. Après action de la collagénase, le gonflement induit par l'ouabaine peut également être prévenu par l'adjonction au milieu de protéines en concentration élevée.

L'étude cinétique des variations de volume cellulaire en fonction du temps après un changement brusque de pression osmotique permet, en outre, de mesurer la perméabilité hydraulique (phase initiale rapide de gonflement) ainsi que la perméabilité aux principaux solutés (phase ultérieure d'adaptation lente) des membranes plasmiques baso-latérales.

#### COUPLAGE ENTRE MÉTABOLISME OXYDATIF ET TRANSPORT D'IONS

Dans le rein entier *in vivo*, il existe une corrélation linéaire bien connue entre la consommation métabolique d'oxygène et la réabsorption tubulaire de sodium. La droite de régression liant ces deux paramètres indique, par extrapolation à l'origine, que la consommation d'oxygène *basale* (en l'absence de réabsorption de sodium), ne représente que 20 pour 100 environ de celle mesurée dans les conditions normales. De plus, la pente de cette droite permet de calculer que l'utilisation d'une molécule de  $\text{O}_2$  permet la réabsorption de 28 à 30 ions  $\text{Na}^+$ . Sachant que, dans le métabolisme oxydatif normal, 1 molécule de  $\text{O}_2$  permet la synthèse de 6 molécules d'ATP (quel que soit le substrat oxydé), et que la Na-K-ATPase assure le transport actif de 3 ions  $\text{Na}^+$  par ATP, il résulte que le couplage direct oxydations-transport actif de Na ne permet d'assurer que le transport de 18  $\text{Na}^+$  par molécule d' $\text{O}_2$ . C'est d'ailleurs le rendement qui est effectivement observé *in vitro* sur des structures épithéliales comme la peau ou la vessie des amphibiens. Dans le rein, donc, on observe un couplage plus efficace, ce qui suggère qu'une fraction du sodium réabsorbé n'est pas transportée par la Na-K-ATPase, mais par un processus n'exigeant pas une consommation d'ATP, ni par conséquent d'oxygène. On sait aujourd'hui que ce processus intervient dans les tubules proximaux et s'effectue par un mécanisme passif de réabsorption de NaCl qui se produit dans les espaces intercellulaires. La conductance ionique ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) et hydraulique de cette voie de passage est très élevée, ce qui

permet des flux nets d'eau et d'électrolytes importants en présence de forces limitées pour les produire. Les forces nécessaires sont la conséquence de la dissociation du bicarbonate dans le fluide tubulaire provoquée par une sécrétion luminale d'ions  $H^+$ , dont résultent :

- 1) une concentration d'ions ( $Cl^-$ ) augmentée dans le fluide tubulaire ;
- 2) une polarisation électrique (lumière positive) de l'épithélium tubulaire ;
- 3) une différence de pression osmotique due au coefficient de réflexion élevé des jonctions cellulaires pour les ions bicarbonates.

Le couplage transport d'ions - métabolisme oxydatif a pu être étudié récemment *in vitro* sur des suspensions de tubules proximaux en survie en utilisant des méthodes biophysiques appropriées (électrodes à  $O_2$ , mesure spectrophotométriques de l'état d'oxydo-réduction des cytochromes et du système NAD-NADH). Il a été montré, sur les cellules épithéliales proximales, que le couplage oxydations-phosphorylations est contrôlé par le rapport ATP/ADP dans la cellule. L'inhibition du transport actif par l'ouabaine entraîne, dans les secondes qui suivent, une augmentation du rapport ATP/ADP, une augmentation de NADH et une inhibition de la respiration. Au contraire, si des tubules intacts en suspension dans un milieu pauvre en potassium (Na-K-ATPase inhibée) sont complétés en  $K^+$ , on observe aussitôt des variations inverses à celles décrites ci-dessus. Ce type d'expériences permet donc de relier quantitativement consommation d' $O_2$  et transport d'ions sur des tubules en survie. Les résultats peuvent être comparés aux mesures faites *in vivo*. En outre, les mécanismes du couplage entre oxydations et phosphorylations peuvent être analysés avec précision. Cette approche s'annonce donc très prometteuse.

### LA GLUCONÉOGÉNÈSE PROXIMALE ET SA RÉGULATION

Des études réalisées soit sur des suspensions tubulaires, soit sur des coupes de segments tubulaires individuellement localisés par voie cytochimique, ont permis de montrer que les segments proximaux contiennent tous les enzymes de la gluconéogénèse : pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose bisphosphatase et glucose-6-phosphatase. Au contraire, les enzymes de la glycolyse sont peu actifs dans ce segment tubulaire (hexokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase). Lorsque les animaux sont soumis à une acidose métabolique, l'activité de la PEPCK augmente dans les tubules proximaux. Le jeûne entraîne des effets de moindre amplitude, mais qui intéressent aussi les autres enzymes de la gluconéogénèse. Parmi les différents composés essayés, les intermédiaires du cycle de Krebs ( $\alpha$ -cétoglutarate, succinate, fumarate, malate) sont les plus efficaces substrats de la gluconéogénèse proximale, puis le pyruvate, le lactate, le dihydroxyacétone et le glutamate.

Sur le plan quantitatif, la gluconéogénèse est loin d'être négligeable ; elle équivaut à environ 15 pour 100 du glucose récupéré par réabsorption à partir du filtrat glomérulaire. Cette synthèse explique que, dans de nombreuses situations, le débit de glucose sortant par la veine rénale est sensiblement égal ou même supérieur à celui qui y entre par l'artère rénale. La gluconéogénèse proximale compense — ou même dépasse — la consommation de glucose par les segments plus distaux des néphrons.

Il est aujourd'hui bien établi que cette néoglucogénèse rénale peut être stimulée, *in vivo* et *in vitro*, par l'hormone parathyroïdienne. Cet effet hormonal utilise l'AMP cyclique comme deuxième messenger. A faible dose, l'AMP cyclique stimule principalement la PEPCK. De plus, une inhibition de la pyruvate carboxylase apparaît pour les fortes doses de cAMP, puisque ces fortes doses diminuent la gluconéogénèse à partir de lactate et de pyruvate, mais non à partir des intermédiaires du cycle de Krebs.

Les catécholamines, via des récepteurs  $\alpha$ , stimulent aussi la néoglucogénèse proximale, mais par un mécanisme ne passant pas par le cAMP. En outre, les agonistes  $\alpha$  diminuent la production intracellulaire de cAMP induite par la PTH. Une étude pharmacologique récente montre que les récepteurs impliqués sont du type  $\alpha_1$ .

De même, l'angiotensine stimule la gluconéogénèse proximale par un mécanisme indépendant du cAMP. Enfin, très récemment, il a été également suggéré que la somatostatine pourrait stimuler et l'insuline inhiber la gluconéogénèse du tubule proximal.

Comme il été établi, par ailleurs, que la PTH et le cAMP modifient *in vitro* la réabsorption de l'eau, des solutés et du phosphate par ce segment tubulaire, on voit que l'utilisation de suspensions tubulaires en survie *in vitro* a permis d'atteindre le double objectif recherché : vérifier, d'abord, que les conditions imposées par la survie *in vitro* sont compatibles avec le maintien, au moins temporaire, des fonctions physiologiques normales et de leurs régulations par les hormones ; étudier, ensuite, les aspects métaboliques qui assurent ces fonctions physiologiques, ainsi que les étapes biochimique qui réalisent le couplage entre métabolisme énergétique et fonction de transport.

F. M.

Le cours a été complété par une série de 9 séminaires portant cette année sur des sujets voisins de celui du cours, à savoir :

18 novembre : M. A. DOUCET : Mesure des ATPases tubulaires *in vitro* et fonctionnement du rein.

25 novembre : M. B. CORMAN : Etude de la réabsorption proximale de l'eau sur le tubule microperfusé *in vitro*.

9 décembre : M. T. ANAGNOSTOPOULOS : Contribution de l'électrophysiologie à l'étude du fonctionnement du tubule proximal.

16 décembre : M. C. ROY : Cellules épithéliales en culture - possibilités et limitations dans l'étude du mécanisme d'action des hormones.

6 janvier : M. C. de ROUFFIGNAC : Les méthodes de microperfusion et de microinjections tubulaires *in vivo* - Possibilités et limitations.

13 janvier : M. C. AMIEL : Le transport tubulaire de phosphate et son contrôle étudié *in vivo* par la méthode de microponction.

20 janvier : M. A. VANDEWALLE : Enzymes clef de la glycolyse et de la néoglucogénèse - Leur distribution le long du néphron.

27 janvier : M. R. ARDAILLOU : Propriétés biochimiques des cellules mésangiales et épithéliales glomérulaires en culture.

3 février : M. R. PODEVIN : Etude du mécanisme de transport des acides organiques sur des vésicules membranaires proximales.

#### TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

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

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

L'analyse de la distribution le long du néphron des sites d'action de diverses hormones polypeptidiques (notamment ceux de la parathormone et de la calcitonine) a été étendue à une espèce supplémentaire, le hamster doré. On sait en effet que la PTH chez cette espèce affecte l'excrétion urinaire de l'ion calcium de façon particulièrement marquée. La répartition dans les segments successifs du néphron de l'adénylate cyclase activable par ces deux hormones n'a pas fait apparaître chez le hamster (par rapport au rat ou au lapin) de différence nette touchant soit la sensibilité soit l'intensité des réponses obtenues.

D'autre part, les effets d'un traitement prolongé par l'acétate de desoxycorticostérone (DOCA) à forte dose sur le fonctionnement des segments tubulaires distaux du lapin ont été étudiés en mesurant l'activité de deux enzymes-

clef : la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  d'une part, l'Adénylate cyclase activable par les hormones d'autre part. Il a été observé que le traitement par la DOCA induit, après 3 jours de traitement, une élévation marquée (entre 2 et 3 fois en moyenne, selon les segments) de l'activité  $\text{Na-K-ATPase}$  dans les portions b et g du tubule contourné distal ainsi que dans les tubules collecteurs. La  $\text{Na-K-ATPase}$  des autres segments tubulaires n'est pas affectée par le traitement ; l'effet décrit ci-dessus concerne spécifiquement l'ATPase sensible à l'ouabaine, et non la  $\text{Mg-ATPase}$ , qui n'est pas modifiée. Chez les mêmes animaux, l'étude de l'adénylate cyclase montre une augmentation qui touche de façon constante et significative la réponse de l'enzyme à la calcitonine dans la portion b du tubule contourné distal. De même, mais de façon moins prononcée, on note aussi une augmentation de la réponse de l'adénylate cyclase à la vasopressine dans le tubule collecteur cortical chez les lapins traités à la DOCA.

b) *Etudes sur tubules en survie in vitro*

Ces études, entreprises l'année écoulée, concernent, dans un premier temps, des mises au point méthodologiques. Elles ont été poursuivies cette année dans deux directions principales.

Le contenu intracellulaire en AMP cyclique de segments tubulaires uniques en survie *in vitro* ainsi que ses variations en réponse à l'application d'hormones appropriées peuvent être maintenant mesurés de façon reproductible et avec une précision satisfaisante par radio-immunoassay. La quantité de tissu utilisée par point correspond à 0,1  $\mu\text{g}$  de protéines totales (environ 0,5 à 1 mm de tubule).

Il est envisagé d'utiliser cette méthode pour rechercher les effets inhibiteurs de certains agonistes, par exemple les agonistes  $\alpha$  adrénérgiques, sur l'accumulation intracellulaire de cAMP induite par des hormones comme la PTH (sur le tubule contourné proximal) ou la vasopressine (sur les segments médullaires du néphron).

D'autre part, la viabilité de segments tubulaires *in vitro* a été recherchée en mesurant la production de  $^{14}\text{CO}_2$  à partir de substrats métaboliques comme le glucose  $\text{U-}^{14}\text{C}$  ou le lactate  $\text{U-}^{14}\text{C}$ . Ceci implique de sélectionner des milieux de survie tamponnés autrement que par l'ion bicarbonate. Il a été possible, en utilisant des milieux nutritifs complets, un support de collagène, et le dextran 40 000 comme macromolécule, de maintenir une activité métabolique élevée et constante pendant au moins 3 heures, et ceci de façon relativement reproductible. Une partie du  $\text{CO}_2$  métabolique produit correspond à un métabolisme oxydatif couplé au transport actif de sodium par les membranes cellulaires, puisque l'ouabaine inhibe cette production de  $\text{CO}_2$  de 50 pour cent ou davantage dans le cas du segment large de la branche

ascendante de l'anse de Henle du rat. Ce segment, d'autre part, utilise le lactate préférentiellement au glucose comme substrat métabolique principal, alors que l'inverse a été observé dans le cas du tubule collecteur. On voit donc que cette approche expérimentale nouvelle s'avère possible et s'annonce prometteuse, puisqu'elle devrait permettre d'aborder une série de problèmes nouveaux, tels que les propriétés de couplage entre métabolisme et transports d'ions, ou encore les effets métaboliques de certaines hormones sur différents segments des néphrons difficiles à étudier par les méthodes ne comportant pas leur isolement par microdissection.

2) *Equipe d'Endocrinologie moléculaire* (S. JARD, D. BUTLEN, P. CLAUSER, B. CANTAU, G. GUILLON, J. PENIT, C. ROY).

a) *Constituants de l'adenyl cyclase rénale sensible à la vasopressine*

Des conditions expérimentales ont été définies qui permettent l'obtention sous des formes solubles et de taille homogène, des constituants principaux de l'adenyl cyclase rénale sensible à la vasopressine : le récepteur (R), l'unité catalytique (C) de l'enzyme et les constituants support de l'action des nucléotides guanyliques sur le système. La présence d'un agent réducteur dans le milieu de solubilisation des membranes et le milieu d'incubation des extraits solubles s'est avérée être un facteur essentiel pour permettre la dissociation des constituants du système et leur réassociation en milieu soluble sous l'influence de Gpp(NH)p (analogue non hydrolysable du GTP) ou du NaF. La taille moléculaire de l'adenyl cyclase solubilisée et non stimulée est de 170 K environ, celle de l'enzyme stimulée par le Gpp(NH)p ou le NaF de 230 K environ. La stimulation de l'enzyme soluble par le NaF ou le Gpp(NH)p s'accompagne d'une conversion de la forme 170 K en forme 230 K. Cette dernière résulte vraisemblablement de l'association de l'unité catalytique de l'adenyl cyclase (C) avec un constituant de 40 K environ assimilable à la protéine (N), telle qu'elle a été caractérisée par T. Pfeuffer. Une méthode de recomplémentation a été mise au point qui permet d'estimer la taille du constituant soluble conférant à l'adenyl cyclase sa sensibilité au NaF ou au Gpp(NAH)p. La valeur obtenue est de 130 K environ. Il est vraisemblable qu'il s'agit là d'un constituant assimilable au facteur G/F caractérisé par Gilman et qui pourrait être le précurseur de l'unité N (40 K). Deux formes lourde (160-170 K) et légère (80 K) du complexe vasopressine-récepteur ont été mises en évidence. La forme lourde est seule sensible à l'action du GTP, ce qui suggère qu'elle pourrait être un complexe entre le récepteur et un autre constituant comportant un site d'action du GTP. Notre hypothèse de travail est qu'il pourrait s'agir d'une sous-unité du facteur G/F (130 K).



b) *Caractérisation des isorécepteurs de la vasopressine*

Des sites de fixation de la vasopressine tritiée ont pu être mis en évidence sur des myocytes de la paroi aortique du rat maintenus en culture primaire. La spécificité de reconnaissance de ces sites (analysés grâce à une série de 15 analogues de structure de la vasopressine) est indiscernable de la spécificité de reconnaissance des récepteurs hépatiques antérieurement caractérisés. Ce résultat confirme d'une manière directe les grandes analogies structurales et fonctionnelles (absence de couplage avec l'adényl cyclase) existant entre récepteurs hépatiques et récepteurs vasculaires de la vasopressine. Ces récepteurs se distinguent en revanche clairement des récepteurs rénaux de l'hormone.

Une étude systématique des effets des ions magnésium et des nucléotides triphosphates sur le récepteur hépatique de la vasopressine a été entreprise. Le GTP réduit l'affinité du récepteur pour la vasopressine, mais n'affecte pas son affinité pour un inhibiteur compétitif de l'hormone (cyclopentaméthylènevaline 4-arginine-8-vasopressine). Cet effet présente donc des analogies avec les effets hétérotropiques du GTP sur de nombreux récepteurs hormonaux couplés à l'adényl cyclase. Il s'en distingue cependant très clairement, comme l'a montré une étude comparative des effets des nucléotides triphosphates sur le récepteur de la vasopressine et le récepteur du glucagon choisi comme prototype de récepteur couplé à l'adényl cyclase. Ainsi, les concentrations actives de GTP sur le récepteur de la vasopressine sont de l'ordre de la millimole, alors qu'elles sont de l'ordre de la micromole dans le cas du récepteur du glucagon. GTP et ATP sont également actifs sur le récepteur de la vasopressine, alors que sur le récepteur du glucagon l'ATP (purifié) est pratiquement inactif. Le Gpp(NH)p, analogue non hydrolysable du GTP, est aussi actif que le GTP sur la fixation de glucagon ; il n'affecte pas la liaison de la vasopressine. Les résultats acquis suggèrent que l'hydrolyse du GTP ou de l'ATP est une étape indispensable à l'expression de leurs effets sur le récepteur de la vasopressine.

L'élimination des ions magnésium du milieu d'incubation des membranes de foie de rat réduit de manière importante l'affinité du récepteur de la vasopressine pour les peptides se comportant comme des agonistes (activation de la phosphorylase), mais non pour les peptides se comportant comme des inhibiteurs compétitifs de l'hormone naturelle.

c) *Effets inhibiteurs de l'angiotensine et des catécholamines sur l'adényl cyclase hépatique*

En collaboration avec Karl Jakobs (Heidelberg), nous avons montré que l'angiotensine et l'adrénaline (en présence de  $\beta$  bloquant) inhibent l'activité

adenyl cyclasique de membranes de foie de rat préparées selon la technique de Neville et en présence d'EDTA. Comme dans le cas d'autres systèmes antérieurement étudiés par K. Jakobs, l'inhibition n'est révélée qu'en présence de GTP (0,1-10  $\mu$ M) et d'un cation monovalent ( $\text{Li} > \text{Na} > \text{K}$ ). L'effet de l'adrénaline s'exerce par l'intermédiaire d'un récepteur de type  $\alpha_2$ . Dans les mêmes conditions expérimentales, la vasopressine est inactive.

d) *Caractérisation des récepteurs hépatiques de l'angiotensine*

Deux ligands tritiés ont été utilisés : ( $^3\text{H}$ )-angiotensine II et ( $^3\text{H}$ )-Sarc $^1$ -Ile $^8$ -angiotensine II. Ce dernier se comporte comme un antagoniste de l'angiotensine sur le test biologique utilisé (activation de la phosphorylase d'hépatocytes fraîchement isolés et maintenus en survie). Des sites spécifiques de liaison ont été caractérisés d'une part sur des hépatocytes isolés, d'autre part sur des membranes purifiées de foie de rat. Sur les membranes, la capacité maximum de liaison est de 800 à 1 000 fmoles/mg de protéine ; les constantes de dissociation sont proches de 1 nM pour les deux ligands tritiés utilisés. Avec une série d'analogues de l'angiotensine, il a été possible d'établir une bonne corrélation entre les affinités relatives de ces analogues pour les sites de liaison détectés et leurs aptitudes relatives à activer la phosphorylase. Comme il est indiqué au paragraphe précédent, les récepteurs de l'angiotensine sont couplés à l'adenyl cyclase. L'angiotensine inhibe l'enzyme en présence de GTP et d'un ion monovalent. Le GTP diminue l'affinité du récepteur pour l'angiotensine, mais n'affecte pas son affinité pour la Sarc $^1$ -Ile $^8$ -angiotensine. Dans ses modalités, cet effet du GTP est très comparable à l'effet du nucléotide sur le récepteur du glucagon (positivement couplé à l'adenyl cyclase). Les ions monovalents diminuent également l'affinité du récepteur. Cet effet, à l'inverse de l'effet du GTP, se manifeste vis-à-vis des agonistes et des antagonistes.

e) *Actions de la vasopressine sur le rein humain*

La vasopressine exerce chez les mammifères de très nombreux effets biologiques (actions antidiurétique, vasopressique, glyco-génolytique, agrégation plaquettaire, consolidation des comportements acquis). Un effort considérable a été entrepris pour la préparation d'analogues de structure de l'hormone naturelle présentant une sélectivité accrue vis-à-vis de l'une ou de l'autre de ces actions, ceci dans la perspective de leur utilisation clinique (compensation des diabètes insipides d'origine centrale, facteur adjuvant de l'hémostase lors d'interventions chirurgicales touchant des territoires vasculaires particulièrement sensibles à la vasopressine, facteur adjuvant de la mémoire). La spécificité de reconnaissance des récepteurs de la vasopressine varie notable-

ment d'une espèce à l'autre. Or, on ne dispose actuellement que de très peu de données pharmacologiques chez l'homme. Rien ne s'oppose dans son principe à la transposition à l'homme des méthodes biochimiques développées chez l'animal pour l'analyse fine de la spécificité de reconnaissance des principaux types de récepteurs de la vasopressine. Deux reins humains prélevés en vue de leur transplantation, mais s'étant révélés impropres à cet usage, ont été mis à notre disposition par « France-Transplant ». Des fractions membranaires purifiées ont été préparées et conservées dans l'azote liquide. Il a été possible sur ce matériel de caractériser les récepteurs de la vasopressine et d'apprécier les activités relatives d'une série d'analogues de l'hormone choisis parmi ceux dont l'utilisation clinique est ou pourrait être envisagée.

f) *Etudes sur les cellules rénales en culture*

L'analyse cinétique fine de la fixation de vasopressine tritiée sur des cellules rénales LLGPK<sub>1</sub> fait apparaître une hétérogénéité apparente des sites de liaison. Les résultats obtenus suggèrent l'existence d'un changement d'affinité consécutif à l'occupation du récepteur par l'hormone. L'exposition de ces cellules à la vasopressine entraîne une désensibilisation de l'adényl cyclase à l'hormone. Dans ses phases précoces, la désensibilisation se traduit essentiellement par une disparition progressive de l'effet du GTP qui, sur l'enzyme non désensibilisée, se manifeste par une diminution du KA d'activation par la vasopressine. Il est ainsi possible que le mécanisme de désensibilisation touche préférentiellement les constituants du système adényl cyclasique qui sont le support de l'action des nucléotides guanyliques.

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

Pendant l'année 1980, l'activité de ce groupe, dirigé par J. BOCKAERT, a été centrée, comme par le passé, sur leur thème principal qui est l'étude des caractéristiques et de la modulation des récepteurs aux neuromédiateurs.

*Les récepteurs sérotoninergiques du système nerveux central*

En collaboration avec M. HAMON, du laboratoire du D<sup>r</sup> GLOWINSKI, nous avons entrepris l'étude comparée des récepteurs sérotoninergiques du système nerveux central. Il existe deux types de récepteurs : un récepteur qui peut être marqué par la sérotonine H<sup>3</sup>, et un récepteur qui est couplé à une adényl cyclase. Les affinités de ces deux types de récepteurs sont différentes, même lorsqu'elles sont déterminées dans des conditions strictement identiques (en particulier en présence de GTP). Le site qui lie la sérotonine H<sup>3</sup> a un

$K_D$  de 11,9nM, alors que le récepteur qui est couplé à une adényl cyclase a une affinité apparente de 330 nM. Le profil pharmacologique de ces deux récepteurs est très différent. Par exemple, des agonistes sérotoninergiques contenant un hétérocycle piperazine  $\alpha$  1-m trifluorométhylphényl piperazine et MK 122 déplacent effectivement la sérotonine  $H_3$ , mais n'ont pas d'action sur l'adényl cyclase. De plus, il n'y a pas de corrélation entre l'affinité d'un grand nombre d'agonistes ou d'antagonistes sur ces deux récepteurs. Malgré cela, la distribution subcellulaire de ces deux types de récepteurs est identique. Chez le nouveau-né, leur distribution régionale dans le système nerveux est identique. La destruction des neurones du striatum par l'acide kaïnique montre que la destruction des récepteurs couplés à l'adényl-cyclase est plus grande que celle des récepteurs liant la sérotonine  $H_3$ . L'ensemble de ces résultats montre que ces deux récepteurs sérotoninergiques sont des entités moléculaires distinctes et que ceux qui sont couplés à l'adényl-cyclase sont localisés au niveau neuronal, au moins dans le striatum.

#### *Les récepteurs dopaminergiques du cortex frontal*

Nous avons contribué à la démonstration de l'existence dans le striatum de rat de deux récepteurs dopaminergiques au moins (voir rapport 1979). Un récepteur  $D_1$  qui est couplé à une adényl-cyclase et un récepteur  $D_2$  non couplé et qui est marqué par les neuroleptiques. Nous avons aussi étudié le récepteur  $D_1$  dans le cortex frontal. Etant donné l'importance des systèmes dopaminergiques corticaux dans l'action des neuroleptiques, nous avons étudié les caractères de la liaison de spiroperidol  $H^3$  (un puissant neuroleptique) aux membranes de cortex frontal. Ce neuroleptique se lie sur deux sites distincts. Le site à haute affinité est typiquement dopaminergique, alors que le site à basse affinité a des caractéristiques sérotoninergiques. Le site dopaminergique est le même que le site  $D_2$  décrit dans le striatum. Nous avons étudié la répartition topographique des sites  $D_1$  et  $D_2$  dans le cortex frontal. Elle n'est absolument pas la même. Alors que le site  $D_1$  est étroitement associé aux terminaisons dopaminergiques, le site  $D_2$  présente une répartition plus diffuse. Il est possible que les sites  $D_1$  soient des sites synaptiques, alors que les sites  $D_2$  seraient localisés dans des régions extrasynaptiques. Il est aussi possible que la dopamine puisse atteindre ces sites par diffusion, jouant ainsi un rôle de neuromodulateur et non pas de neuromédiateur.

#### *Mécanismes de désensibilisation du récepteur $\beta$ -adrénergique des cellules gliales tumorales en culture*

Le nombre de récepteurs aux neuromédiateurs n'est pas constant dans une cellule. Il dépend du degré de stimulation de ces récepteurs par leurs agonistes et de certains facteurs de l'environnement cellulaire (hormonal par exemple). La stimulation d'un récepteur par des agonistes induit généralement une dimi-

nution du nombre de récepteurs dans la cellule. Ce phénomène est appelé désensibilisation. Les mécanismes moléculaires de ce phénomène ne sont pas encore très clairs. Nous les avons étudiés en détail dans des cellules gliales C<sub>6</sub> en culture. Dans ces cellules, le récepteur  $\beta$ -adrénergique est couplé à une adényl-cyclase. Les caractéristiques de ce couplage et son évolution au cours de la désensibilisation ont été analysées. L'activation de l'adényl-cyclase par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques est une fonction Michaelienne de la concentration du complexe hormone-récepteur (HR). L'affinité apparente de ce complexe pour l'adényl-cyclase (K) est égale à 0,24 (RT), (RT) étant la concentration maximale de récepteurs. Ces observations sont interprétables si l'on admet un modèle de « collision-coupling » entre le récepteur et l'adényl-cyclase. Au cours de la désensibilisation par les agonistes, le nombre de récepteurs et la stimulation de l'adényl-cyclase décroissent. De plus, l'affinité apparente du récepteur pour les agonistes est réduite, alors que celle pour les antagonistes n'est pas modifiée. La cinétique de désensibilisation montre clairement que la perte d'activation de l'adényl-cyclase précède la perte du nombre de récepteurs. De plus, si les cellules sont traitées par un inhibiteur de la synthèse protéique, ou mises à 4 °C, on observe une désensibilisation de l'adényl-cyclase sans perte du nombre de récepteurs. L'analyse de ces données permet de montrer que la désensibilisation se produit en deux étapes : 1) un découplage fonctionnel du récepteur et de l'adényl-cyclase (l'affinité du complexe (RH) passe de 0,24 (RT) à 1,2 (RT) après 3 heures de désensibilisation) ; 2) les récepteurs ainsi découplés disparaissent de la membrane.

#### *Les groupements SS et SH du récepteur $\beta$ -adrénergique*

Nous avons montré que le récepteur  $\beta$ -adrénergique contient un pont disulfure qui peut être réduit par le dithiothreitol (DTT). Sur des cellules intactes, un bloquant des groupes — SH (la NEM) réduit de 21 pour 100 le nombre de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Si le récepteur est préalablement réduit, ce blocage est complet. Sur des cellules isolées, la NEM ne change pas significativement le nombre des récepteurs. Cependant, 33 pour 100 des récepteurs sont bloqués par la NEM si le récepteur est occupé par un agoniste. Un dérivé thiol du propranolol (un antagoniste  $\beta$ -adrénergique) a été synthétisé. Il bloque 22 pour 100 des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques natifs et 55 pour 100 des récepteurs préalablement réduits. Ces résultats peuvent être interprétés si l'on admet que le récepteur  $\beta$ -adrénergique contient un pont disulfure en équilibre avec un groupement -SH. Deux formes du récepteur existeraient. Seule, une des formes peut être bloquée par la NEM ou le dérivé thiol du propranolol. L'équilibre entre les deux formes dépend des conditions d'oxydo-réduction dans lesquelles est placé le récepteur (blocage par la NEM plus important sur les cellules que sur les membranes et augmentation du blocage par les agonistes).

*Localisation (neuronale ou gliale) des récepteurs  
couplés à une adényl-cyclase dans le système nerveux central*

De nombreuses études ont été consacrées aux récepteurs des neurotransmetteurs dans le système nerveux central. Cependant, très peu de données existent sur leur rôle fonctionnel. Pour beaucoup d'entre eux, on ne sait même pas si leur localisation est neuronale ou gliale. Une voie d'approche est de préparer des cultures homogènes de ces deux types cellulaires. Nous avons commencé ce travail. Des cellules gliales en culture primaire sont préparées à partir de cellules dissociées (contenant des cellules gliales et des neurones) de cortex cérébral de souris de 1 jour. On peut donc comparer les récepteurs aux neurotransmetteurs présents sur cette population initiale mixte (gliales + neurones) avec ceux présents sur la population homogène de cellules gliales ne contenant plus de neurones. Les études montrent que les récepteurs dopaminergiques et sérotoninergiques couplés à une adényl-cyclase qui disparaissent au cours de la culture sont vraisemblablement localisés sur des neurones. Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et à l'adénosine sont détectés sur les cellules dissociées initiales et restent présents sur les cellules gliales. Ce résultat n'exclut pas qu'ils ne soient pas également présents sur les neurones. Les caractéristiques pharmacologiques des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques des cellules gliales ont été analysées. La spécificité de ces récepteurs pour les agonistes et les antagonistes indique clairement que les cellules gliales contiennent à la fois des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  adrénergiques. Ces résultats excluent la proposition faite par certains auteurs que les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques sont exclusivement neuronaux, alors que les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques seraient gliaux. Nous étudions la possibilité que ces deux récepteurs puissent être exprimés par la même cellule.

PUBLICATIONS

M. IMBERT-TEBOUL, C. BAILLY, D. CHABARDÈS et F. MOREL, *Distribution de l'adényl-cyclase sensible au glucagon le long du néphron du rein de rat* (Assoc. des Physiologistes de Langue française, Réunion spécialisée de Physiol. rénale, Lausanne, *J. de Physiol.*, 76, N° 8, Abstr. 37A, 1980).

C. BAILLY, M. IMBERT-TEBOUL et F. MOREL, *Effet du glucagon exogène à dose physiologique sur la fonction rénale de rat* (Ibid., Abstr. 35A, 1980).

F. MOREL, *Milieu intérieur et régulation hormonale du fonctionnement rénal* (Fondation Singer Polignac. *La transmission neuromusculaire. Les Médiateurs et le milieu intérieur*, Masson, Chap. 16, 231-244, 1980).

F. MOREL, M. IMBERT-TEBOUL and D. CHABARDÈS, *Cyclic nucleotides and tubule function (Adv. Cyclic Nucleotides, 12, 301-313, 1980).*

M. IMBERT-TEBOUL, D. CHABARDÈS and F. MOREL, *Vasopressin and catecholamines sites of action along the rabbit, mouse and rat nephron (7th Symp. on Nephrol., Hannover 1979, Ed. J. Bahlmann a. J. Brod, Contr. Nephrol., 21, 41-47, 1980).*

A. DOUCET, F. MOREL and A.I. KATZ, *Microdetermination of Na-K-ATPase in single tubules : its application for the localization of physiologic processes in the nephron (Int. J. Biochem., 12, 47-52, 1980).*

C. BAILLY, M. IMBERT-TEBOUL, D. CHABARDÈS, A. HUS-CITHAREL, M. MONTÉGUT, A. CLIQUE and F. MOREL, *The distal nephron of rat kidney : a target site for glucagon (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 77, N° 6, 3422-3424, 1980).*

F. MOREL, M. IMBERT-TEBOUL and D. CHABARDÈS, *Distribution of hormone-dependent adenylate cyclase in the nephron and its physiological significance (Ann. Rev. Physiol., 43, 569-581, 1981).*

F. MOREL, *Sites of hormone action in the mammalian nephron (Editorial Review, Am. J. Physiol., 240, N° 3, F159-F164, 1981).*

F. MOREL, *Trente ans de Physiologie rénale (Exposé au cours de la remise du prix franco-américain Lounsbery, C.R. Acad. Sci. Paris, 290, 192, Vie académique).*

F. MOREL, D. CHABARDÈS and M. IMBERT-TEBOUL, *Segmental heterogeneity of the nephron (Invited lecture, Proc. 28th Int. Congr. Physiol., Budapest, Abstr. 0035, 33, 1980).*

D. CHABARDÈS, M. IMBERT-TEBOUL and F. MOREL, *Multiple hormonal regulation of the cortical thick ascending limb of the rat nephron (Ibid., Abstr. 1060, 352, 1980).*

M. IMBERT-TEBOUL, D. CHABARDÈS, C. BAILLY and F. MOREL, *Glucagon sensitive adenylate-cyclase along the rat nephron (Ibid., Abstr. 1854, 485, 1980).*

C. BAILLY and M. IMBERT-TEBOUL, *Effect of exogenous glucagon, at physiological levels, on the renal tubular function in the rat (Ibid., Abstr. 0794, 308, 1980).*

M. IMBERT-TEBOUL, D. CHABARDÈS and F. MOREL, *Ontogenesis of hormone-dependent adenylate-cyclase in isolated segments of the rat nephron (Intern. Symp. on Development of the mammalian Kidney, Montreux, sept. 1980).*

C. AMIEL, D. CHABARDÈS et C. BAILLY, *Effets de l'hormone parathyroïdienne sur le rein, sites d'action et mode d'action cellulaire (Actual. Néphrologiques de l'Hôpital Necker, Flammarion Médec.-Sci. Edit., 21-56, 1981).*

D. MARCHAIS and J. BOCKAERT, *Is there a connection between high affinity (<sup>3</sup>H)-spiperone binding sites and DA-sensitive adenylate cyclase in corpus striatum ? (Biochem. Pharmacology, 29, 1331-1336, 1980).*

D. MARCHAIS, J.P. TASSIN and J. BOCKAERT, *Dopaminergic component of <sup>3</sup>H-spiroperidol binding in the rat anterior cerebral cortex (Brain Research, 183, 235-240, 1980).*

D. NELSON, A. HERBERT, A. ENJALBERT, J. BOCKAERT and M. HAMON, *Serotonin-sensitive adenylate cyclase and <sup>3</sup>H-serotonin binding sites in the CNS of the rat. I. - Kinetic characteristics and pharmacological properties (Biochem. Pharmacology, 29, 2445-2453, 1980).*

D. NELSON, A. HERBERT, J. ADRIEN, J. BOCKAERT and M. HAMON, *Serotonin-sensitive adenylate cyclase and <sup>3</sup>H-serotonin binding sites in the CNS of the rat. II. - Respective regional and subcellular distributions and ontogenic developments (Biochem. Pharmacology, 29, 2455-2463, 1980).*

V. HOMBURGER, M. LUCAS, B. CANTAU, J. BARABE, J. PENIT and J. BOCKAERT, *Further evidence that desensitization of beta-adrenergic sensitive adenylate cyclase proceeds in two steps : modification of the coupling and loss of beta-adrenergic receptors (J. Biological Chemistry, 255, 10436-10444, 1980).*

H. GOZLAN, V. HOMBURGER, M. LUCAS, J. BOCKAERT and R. MICHELET, *Irreversible inactivation of beta-adrenergic receptors of C<sub>6</sub> glioma cells. Synthesis and study of a thiol derivative of propranolol (Biochimie, 62, 455-462, 1980).*

J. BOCKAERT, V. HOMBURGER, M. LUCAS and A. DOLPHIN, *Le récepteur beta-adrénergique du système nerveux central (J. Pharmacologie, 11, 72-73, 1980).*

C. EBERSOLT, M. PEREZ and J. BOCKAERT, *Neuronal, glial, and meningeal localizations of neurotransmitter-sensitive adenylate cyclases in cerebral cortex of mice (Brain Research, 213, 139-150, 1981).*

C. EBERSOLT, M. PEREZ, G. VASSENT and J. BOCKAERT, *Characteristics of the  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenergic-sensitive adenylate cyclases in glial cell primary cultures and their comparison with  $\beta_2$ -adrenergic-sensitive adenylate cyclase of meningeal cells (Brain Research, 213, 151-161, 1981).*



J. BOCKAERT, *Role of cyclic nucleotides insynaptic transmission* (Les Houches, Session XXXIII, 1979, *Membranes et communication intercellulaire*. R. Balian et al. Eds., North Holland Publishing Company, 387-402, 1981).

O. COLARD, A. KERVABON and C. ROY, *Effects on adenylate cyclase activities of unsaturated fatty acid incorporation into rat liver plasma membrane phospholipids. Specific modulation by linoleate* (*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 95, 97-102, 1980).

C. GUILLON, P.O. COURAUD, D. BUTLEN, B. CANTAU and S. JARD, *Size of vasopressin receptors from rat liver and kidney* (*Eur. J. Biochem.*, 111, 287-294, 1980).

D. BUTLEN, G. GUILLON, B. CANTAU and S. JARD, *Comparison of the developmental patterns of vasopressin, glucagon and  $\alpha$ -adrenergic receptors from rat liver membranes* (*Mol. Cell. Endocrinol.*, 19, 275-289, 1980).

C. ROY, A.S. PRESTON and J.S. HANDLER, *Insulin and serum increase the number of receptors for vasopressin in a kidney-derived line of cells grown in a define medium* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 5979-5983, 1980).

Y. ZAGYANSKI and S. JARD, *The effect of amphotericin B on ligand-induced receptor immobilization* (*Exp. Cell. Res.*, 132, 387-398, 1981).

S. JARD, B. CANTAU and K.H. JAKOBS, *Angiotensin II and  $\alpha$ -adrenergic agonists inhibit rat liver adenylate cyclase* (*J. Biol. Chem.*, 256, 2603-2606, 1981).

C. ROY and D.A. AUSIELLO, *Characterization of (8-lysine) vasopressin binding sites on a pig kidney cell line (LLC-PK<sub>1</sub>). Evidence for hormone-induced receptor transition* (*J. Biol. Chem.*, 256, 3415-3422, 1981).

C. ROY, D. HALL, M. KARISH and D.A. AUSIELLO, *Relationship of (8-lysine)-vasopressin receptor transition to receptor functional properties in a pig kidney cell line (LLC-PK<sub>1</sub>)* (*J. Biol. Chem.*, 256, 3423-3427, 1981).

#### MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS

M. François MOREL a présenté une Conférence sur invitation au XXVIII<sup>e</sup> Congrès international de Physiologie de Budapest (juillet 1980), auquel Martine IMBERT-TEBOUL, Danielle CHABARDÈS et Claire BAILLY ont également participé et présenté des communications. François MOREL et Martine IMBERT-TEBOUL ont participé au Symposium international sur le Développement du Rein de mammifères, à Montreux (septembre 1980). François MOREL a fait

un exposé sur invitation à un Symposium hors cadre pour la 48<sup>e</sup> Réunion de l'Association des Physiologistes, à Genève (septembre 1980) et il a effectué une mission scientifique à la Faculté des Sciences de Rabat (février 1981). Danielle CHABARDÈS, Martine IMBERT-TEBOUL et Claire BAILLY ont participé et présenté des communications à une Réunion de Physiologie rénale de l'Association des Physiologistes à Lausanne (mars 1980). Alain DOUCET a fait un exposé sur invitation dans un Symposium du VIII<sup>e</sup> Congrès international de Néphrologie (Athènes, juin 1981).

M. Serge JARD a participé au XIX<sup>e</sup> Colloque sur les Protéines et liquides biologiques (Bruxelles, 1981) ; il a été l'un des organisateurs de la 4<sup>e</sup> Conférence internationale sur les Nucléotides cycliques (Bruxelles, 1980), à laquelle Joël BOCKAERT a présenté un exposé sur invitation, et Jean-Pierre MAUGER, Marguerite LUCAS et Vincent HOMBURGER ont présenté une communication.

M. Joël BOCKAERT a présenté sur invitation, au IV<sup>e</sup> Taniguchi Symposium, un exposé sur les récepteurs des neurotransmetteurs, à Kyoto, Japon (1980). Enfin, Joël BOCKAERT, Michèle PEREZ et Catherine EBERSOLT ont participé à la 1<sup>re</sup> Réunion internationale de la Société internationale for Development of Neurosciences (Strasbourg, 1980).

#### DISTINCTION

F. MOREL a reçu le prix franco-américain de la Fondation Richard Lounsbery (16 juin 1980).

#### DIPLOMES ET PROMOTIONS

MM. J. PREMONT, G. GUILLON et A. DOUCET ont soutenu leur Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences.

G. BAILLY a soutenu son Diplôme du D.E.R.B.H.

#### EQUIPE RATTACHÉE AU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Les recherches du Groupe de Neuroendocrinologie Cellulaire dirigé par M<sup>me</sup> 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*

Les résultats ayant fait l'objet d'une publication depuis mai 1980 concernent exclusivement des recherches relatives aux mouvements membranaires en relation avec le processus sécrétoire dans les cellules à prolactine en culture et mettant en œuvre une approche de cytochimie ultrastructurale.

L'emploi de la Concanavalline A-Peroxydase (Con A-PO), comme marqueur de la surface cellulaire, a permis de suivre à 37°, l'endocytose de la membrane plasmique dans des cellules à prolactine normales en culture primaire et de comparer ce processus à celui qui avait été précédemment décrit dans des cellules à prolactine de la lignée SD1. On constate que la première phase de l'endocytose jusqu'à l'étape golgienne est identique dans les cellules normales et les cellules clonales. Au delà de cette étape, on observe une différence importante entre ces deux types de cellules à prolactine. Au lieu d'observer l'accumulation dans la zone golgienne de citernes tapissées de Con A-PO sur leur face interne (cellules clonales), on observe dans les cellules normales le transfert du matériel endocytosé vers la surface de la matrice des grains de sécrétion, plus volumineux et nombreux que dans les cellules clonales. En concomitance, on observe que la sécrétion de prolactine est stoppée, alors qu'elle était maintenue dans les cellules clonales traitées de façon identique (TIXIER-VIDAL et coll.).

D'autre part, un progrès technique important en immunocytochimie ultrastructurale a été obtenu par la mise au point d'un fixateur permettant de localiser pour la première fois du matériel sécrétoire antigénique (prolactine) dans les citernes du reticulum rugueux, ainsi que dans des citernes du reticulum lisse golgien. Cette technique, qui s'est révélée depuis applicable à des cellules clonales, va permettre de suivre le déplacement de la prolactine dans les différents compartiments du reticulum endoplasmique en fonction de traitements hormonaux ou pharmacologiques (Claude TOUGARD).

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

Dans le cadre de ses recherches sur les cellules précurseurs de lignées neuronales et gliales dans l'hypothalamus, Françoise DE VITRY a mis en œuvre une approche immunocytochimique, pour suivre la localisation cellulaire de deux marqueurs, l'un neuronal (énolase spécifique des neurones, ou 14-3-2) et l'autre glial (S 100). Chez l'adulte, l'antigénicité S 100 est localisée dans la couche épendymaire et l'antigénicité 14-3-2 dans les neurones magnocellulaires. Par contre, aux stades néonataux du développement fœtal, les deux antigénicités sont présentes simultanément dans une même cellule au

niveau de l'épendyme. Ces cellules restent bipotentielles au cours de leur migration de l'épendyme vers le territoire final où les deux antigénités se ségrègent dans des types cellulaires différents. Il existerait donc au niveau de l'épendyme des cellules souches précurseurs communs aux deux lignées neuronale et gliale.

Les conditions permettant la survie et la différenciation morphologique et biochimique de neurones hypothalamiques en culture primaire en absence de sérum ont été établies. On a montré, d'une part, la nécessité d'un facteur d'attachement différent de la fibronectine et qui se lie à la surface du récipient de culture après incubation préalable avec du sérum. D'autre part, l'œstradiol  $17\beta$  ( $10^{-12}M$ ) est indispensable pour une bonne survie des neurones et augmente le rapport neurones/cellules gliales. Dans ces conditions, l'activité de l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine (ChAT) augmente rapidement en culture, alors que le contenu en tyrosine hydroxylase se maintient. Le contenu en TRH décroît en culture, mais on observe en même temps une forte capacité de libération. L'étude du rôle régulateur des hormones sur le développement neuronal se poursuit (Annie FAIVRE-BAUMAN, J. PUYMIRAT).

On a étudié l'ontogénèse dans l'hypothalamus et les hémisphères cérébraux de deux enzymes dégradant les neuropeptides : une pyroglutamate aminopeptidase et une « post-proline cleaving enzyme », en collaboration avec le groupe de K. BAUER (Berlin). On montre que ces deux enzymes présentent leur activité spécifique maximale aux tout premiers stades fœtaux (12° jour) et que celle-ci décroît ensuite, alors que la teneur en neuropeptides augmente. L'activité d'une peptidase classique, la leucyl-arylamidase, présente au contraire une croissance continue pendant le développement fœtal. On recherche l'origine cellulaire de ces enzymes (Annie FAIVRE-BAUMAN).

#### PUBLICATIONS

D. GOURDJI et A. TIXIER-VIDAL, *Les lignées de cellules à prolactine : un modèle propice à l'étude du mode d'action des neuropeptides hypophysiotropes* (*J. Physiol.*, Paris, 76, 233-241, 1980).

D. GOURDJI et A. TIXIER-VIDAL, *Control of prolactin (PRL) in rat prolactin secreting tumor cell lines*. (In : *Pituitary Adenomas*, 2nd European Workshop, Paris, septembre 1979, Ed. by P.J. Derome, C.P. Jedynek et F. Peillon, Asclepios, France, 59-70, 1980).

J.D. VINCENT, B. DUFY, D. GOURDJI and A. TIXIER-VIDAL, *Electrical correlates of prolactin secretion in cloned pituitary cells* (In : *Central and*

*Peripheral Regulation of Prolactin Function*, Ed. by Mc Leod and U. Scapagnini, Raven Press, New York, 141-157, 1980).

A. MORIN, C. AUFFRAY, J.N. LAVERRIERE, D. GOURDJI and A. TIXIER-VIDAL, *Thyroliberin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of mRNA turn-over in rat prolactin cells* (*Eur. J. Cell. Biol.*, 22, 61, 1980).

J.D. VINCENT, B. DUFY, J.M. ISRAEL, L. ZYZEK, J. DUFY-FABRE, D. GUERIN, D. GOURDJI and A. TIXIER-VIDAL, *Neurohormonal communication : an electrophysiological study of the membrane properties of anterior pituitary cells* (*In : Progress in Psychoneuroendocrinology*, Ed. by F. Brambilla, G. Ragnani and D. de Wied, 25-37, 1980).

D. GOURDJI, *Effets de la dopamine et de la bromocriptine sur les cellules à prolactine de rat* (Colloque sur la bromocriptine, Paris, 14 mars 1980, Editions Sandoz, 45-57, 1980).

D. GOURDJI, D. BATAILLE, G. ROSSELIN and A. TIXIER-VIDAL, *Vasoactive intestinal peptide (VIP) and TRH release PRL by different cellular mechanisms in a rat pituitary cell line (GH3/B6)* (*In : Central and Peripheral Regulation of Prolactin Function*, Ed. by U. Scapagnini, R.G. d'Agata and P.L. Canonic, Raven Press, 357-360, 1980).

A. MORIN, C. AUFFRAY, J.N. LAVERRIERE, D. GOURDJI and A. TIXIER-VIDAL, *Thyroliberin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of mRNA turn-over in rat prolactin cells (GH3/B6)* (*Biologie Cellulaire*, 39 (3), 52 a).

C. TOUGARD, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL, *Electron-microscopic cytochemical studies on the secretory process in rat prolactin cells in primary cultures* (*Am. J. of Anat.*, 158, 471-490, 1980).

C. TOUGARD, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL, *Effect of various fixatives on the subcellular localization of prolactin in rat anterior pituitary cells using preembedding or postembedding immunocytochemical methods* (*VIth Int. Histochem. Cytochem. Congress*, 1980, Brighton, 381).

C. TOUGARD, D. GROUSELLE, M.F. MOREAU, R. PICART et A. TIXIER-VIDAL, *Etude dynamique d'antigènes membranaires des cellules à prolactine de la lignée GH3 par immunocytochimie ultrastructurale* (5<sup>e</sup> Colloque annuel du Cercle Français de Biologie Cellulaire, octobre 1980, *Biologie Cellulaire*, 39, 16 a, 1980).

F. DE VITRY, R. PICART, C. JACQUE, L. LEGAULT, P. DUPOUEY and A. TIXIER-VIDAL, *Presumptive common precursor for neuronal and glial cell lineages in mouse hypothalamus* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 4165-4169, 1980).

A. FAIVRE-BAUMAN, E. ROSENBAUM, J. PUYMIRAT, D. GROUSELLE and A. TIXIER-VIDAL, *Differentiation of fetal mouse hypothalamic cells in serum-free medium (Developm. Neurosci., 4, 118-129, 1981).*

A. FAIVRE-BAUMAN, H. KNISATCHEK, A. TIXIER-VIDAL and K. BAUER, *Ontogenesis of neuropeptide degrading enzymes in the mouse brain (J. Neurosci. Res., 6, 63-74, 1981).*

A. TIXIER-VIDAL, A. FAIVRE-BAUMAN, J. PUYMIRAT, E. ROSENBAUM and D. GROUSELLE, *Expression of neuronal activities in culture of dissociated fetal mouse hypothalamic cells. Effects of hormones as studied in serum-free medium (Adv. Physiol. Sci., 14, 101-105, 1981).*

A. TIXIER-VIDAL, R. PICART and M.F. MOREAU, *Membrane traffic in relation with prolactin secretion in normal and in clonal rat prolactin cells in culture (Abstracts Second International Congress on Cell Biology, 1980, Berlin, M 521, 175, 1980).*

#### MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS

M<sup>me</sup> TIXIER-VIDAL et/ou certains de ses collaborateurs ont participé aux réunions suivantes : Colloque de Neurosciences, Le Touquet ; Congrès de la Société Française de Neuroendocrinologie Expérimentale, Montpellier ; 1<sup>er</sup> Congrès Français d'Endocrinologie, Montpellier ; Congrès « Mécanismes Moléculaires de la Régulation Post-Transcriptionnelle chez les Eucaryotes, Montpellier ; Colloque Franco-Allemand de Neuroendocrinologie, Sainte-Odile ; Réunion de la Société Française de Microscopie Electronique, Poitiers ; Colloque International de Radioimmunologie, Lyon ; Congrès annuel du Cercle Français de Biologie Cellulaire, Paris ; International Congress of Developmental Neurosciences, Strasbourg ; International Academy of Pathology (Table Ronde sur les Récepteurs), Paris. A l'étranger : Congrès International de Biologie Cellulaire, Berlin ; 1st Gordon Conference on Prolactin, U.S.A. ; Réunion Annuelle de la Société Européenne de Culture de Tissus, Leiden ; Congrès International d'Histochimie et de Cytochimie, Brighton ; Congrès International de Physiologie, Budapest ; Congrès de l' « International Society of Biochemical Endocrinology », Dubrovnik.

M. J.N. LAVERRIERE a soutenu une thèse de Doctorat de 3<sup>e</sup> cycle.

M<sup>me</sup> A. FAIVRE-BAUMAN a soutenu sa thèse de Doctorat d'Etat.