

Physiologie cellulaire

M. François MOREL, professeur

Le cours de physiologie cellulaire a été consacré, cette année, à poursuivre le sujet traité l'année dernière sous le titre « biochimie et physiologie du tubule rénal isolé ». L'ensemble de l'enseignement a porté sur la discussion critique des résultats obtenus pour l'un des segments particulièrement important du néphron des mammifères, le « segment de dilution » (branche ascendante large de l'anse de Henle).

On sait en effet depuis plus de vingt ans, grâce à des études effectuées sur le rein *in situ* mettant en œuvre la méthode des microponctions tubulaires, que ce segment joue un rôle majeur dans le mécanisme de concentration et de dilution de l'urine chez les mammifères. Les cellules épithéliales formant la paroi de ce segment tubulaire sont capables de réabsorber un excès d'électrolytes (principalement des ions sodium et chlorure) par rapport au solvant, l'eau, de sorte que le fluide délivré aux segments ultérieurs du néphron possède une pression osmotique basse, sensiblement égale à la moitié de celle du plasma systémique. D'où l'appellation de « segment de dilution » donnée à cette portion du néphron.

*
**

L'étude des mécanismes cellulaires qui permettent l'accomplissement de cette importante fonction physiologique a été rendue possible depuis une dizaine d'années par la mise en œuvre systématique chez le lapin de la méthode de microperfusion tubulaire *in vitro*. Cette méthode assure en effet le contrôle expérimental des milieux qui baignent les deux faces des cellules épithéliales et permet la mesure quantitative des flux nets et des flux unidirectionnels de substance qui traversent les cellules. Encore convient-il, pour interpréter correctement les données obtenues à l'aide d'indicateurs radioactifs, de prendre en compte la « géométrie » particulière de ce système expérimental et, lors de l'intégration des variations d'activité spécifique du traceur en fonction de la longueur tubulaire, de corriger les équations de

façon appropriée s'il existe un flux net important pour l'espèce chimique étudiée. De même, les mesures électrophysiologiques effectuées sur tubule perfusé *in vitro* exigent « une analyse de câble » et la détermination précise de la constante d'espace du système perfusé. Ces aspects méthodologiques ont été discutés en détail dans le cours avant que soient systématiquement analysés les résultats expérimentaux eux-mêmes.

La plupart des informations disponibles concernant les propriétés de perméabilité et de transport des cellules du segment de dilution ont été obtenues chez le lapin. C'est en effet chez cette espèce que la micro-dissection des segments isolés nécessaires est la plus facile sans traitement enzymatique préalable du tissu rénal. Cependant, dans les toutes dernières années, plusieurs groupes de chercheurs, notamment aux USA et au Japon, ont réussi la micro-perfusion du segment de dilution chez la souris et le rat.

*
**

Chez toutes les espèces étudiées jusqu'ici, et contrairement aux autres segments tubulaires du néphron, le segment de dilution présente une lumière électropositive par rapport au milieu pérítubulaire lorsqu'il est perfusé *in vitro*. L'amplitude de cette différence de potentiel dépend de la concentration ionique (Na^+ , K^+ et Cl^-) dans le fluide luminal ; elle peut atteindre + 25 à + 30 mV lorsque la concentration de NaCl du milieu de perfusion est de l'ordre de 50 mM. Elle s'abaisse à + 6 mV environ lorsqu'un débit de perfusion élevé permet de maintenir cette concentration égale à celle du milieu pérítubulaire (150 mM). Pour un débit de perfusion voisin des valeurs physiologiques (environ 5 nanolitres par minute), le fluide tubulaire voit sa pression osmotique s'abaisser le long du segment perfusé par suite d'une importante réabsorption nette d'ions Na^+ et Cl^- au travers de la paroi par ailleurs imperméable à l'eau. Les arguments expérimentaux suivants ont fait penser, pendant des années, que la composante active de ce transport de NaCl concernait spécifiquement les ions chlore. 1) le flux net de Cl^- se produit à la fois contre les gradients chimique et électrique transtubulaires ; 2) la suppression des ions chlore du milieu luminal entraîne une dépolarisation électrique de la paroi tubulaire ; 3) le rapport des flux unidirectionnels des ions Cl^- est incompatible avec l'équation de Ussing. Lorsque les mêmes critères sont appliqués aux mouvements des ions Na^+ , il n'y a pas d'indication formelle qu'il existe une composante active dans le transport du sodium dans ce segment tubulaire. Et pourtant l'addition d'ouabaine au milieu pérítubulaire bloque le transport des deux ions et supprime la différence de potentiel transtubulaire. Or l'ouabaine est un inhibiteur spécifique de la Na-K ATPase à l'activité de laquelle est associé un transport actif de Na^+ et de K^+ .

Des expériences toutes récentes ont permis de lever cette contradiction apparente et de se faire une représentation cohérente du mécanisme de réabsorption des ions Na^+ et Cl^- par le segment de dilution. GREGER a montré en effet que lorsque les milieux baignant les deux faces de l'épithélium ne contiennent pratiquement pas de sodium — une condition très difficile à réaliser en pratique — alors la paroi tubulaire est complètement dépolarisée électriquement et la composante active du flux net de chlore est supprimée. Simultanément, la résistance électrique de la paroi augmente. Ces résultats prouvent que les flux de sodium et de chlore sont étroitement couplés.

*

**

En termes de physiologie cellulaire, les résultats expérimentaux disponibles (dont l'analyse détaillée a été faite dans le cours) conduisent à la description qui suit.

L'imperméabilité à l'eau du segment de dilution résulte d'un coefficient de perméabilité hydraulique très bas au niveau des jonctions intercellulaires d'une part, au niveau de la membrane luminale des cellules d'autre part.

En ce qui concerne les mouvements d'électrolytes, il convient de distinguer pour eux deux voies de passage : a) une voie extracellulaire qui comporte, en série, les jonctions intercellulaires (apicales) et les espaces intercellulaires entre les membranes latérales des cellules et b) une voie transcellulaire qui implique le franchissement successif de la membrane apicale, puis de la membrane basolatérale des cellules.

a) la voie intercellulaire possède une conductance élevée pour les ions, particulièrement pour les cations mono- et divalents (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+}). Cette conductance explique la relativement faible résistance électrique de la paroi de ce segment. Compte tenu de la polarité électrique (lumière positive) de l'épithélium, la voie intercellulaire pourrait être le siège d'une réabsorption nette par simple diffusion de cations contre leur gradient de concentration.

b) la voie transcellulaire met en œuvre deux membranes dont les propriétés sont essentiellement différentes. Dans la membrane baso-latérale des cellules se trouve localisée la Na-K ATPase qui assure, par transport actif, la sortie des ions Na^+ intracellulaires et la pénétration des ions K^+ . L'activité de cette pompe cationique maintient la concentration du sodium dans la cellule à un bas niveau et assure la polarité électrique des membranes cellulaires (environ — 60 mV). Le gradient électrochimique ainsi engendré pour les ions sodium se répercute au niveau des membranes apicales, puisque la voie extracellulaire représente un shunt de faible résistance ohmique. La péné-

tration des ions Na^+ et Cl^- de la lumière tubulaire dans la cellule à travers la membrane apicale se produirait par un mécanisme de cotransport obligatoire des deux espèces ioniques, le gradient favorable existant pour le sodium permettant l'accumulation des ions Cl^- dans la cellule au-dessus de leur potentiel d'équilibre. Ce mécanisme de cotransport apical est bloqué par certains diurétiques comme le furosémide. Pour rendre compte du potentiel électrique transtubulaire positif du côté luminal, il est nécessaire qu'existe une composante électrogénique dans la membrane apicale. Une hypothèse simple consiste à postuler que la stoechiométrie du processus de cotransport de Na^+ et Cl^- est différente de l'unité, par exemple comporte 2 Cl^- par Na^+ transporté. Dès lors, le flux net de réabsorption de NaCl impliquerait, pour chaque ion Na^+ activement expulsé hors de la cellule du côté basal par la Na-K ATPase , la pénétration dans la cellule d'un Na^+ et 2 Cl^- du côté luminal par cotransport. Un deuxième ion Na^+ , diffusant passivement dans la voie intercellulaire (le long du gradient électrique correspondant au potentiel transépithélial) assurerait la neutralité du bilan de charge du flux net de NaCl , les ions Cl^- accumulés dans la cellule diffusant eux-mêmes passivement dans l'espace périrubulaire à travers les membranes cellulaires baso-latérales. Dans ce schéma, qui rend compte des résultats expérimentaux disponibles, on voit donc que la composante active primaire (couplée au métabolisme énergétique) du transport net de NaCl est représentée par l'activité de la Na-K ATPase . L'absorption des ions Cl^- est énergisée par couplage du flux de Cl^- au flux de Na^+ le long de son gradient électrochimique à travers la membrane apicale. Enfin, ce mécanisme de cotransport, de par sa stoechiométrie (2 Cl^- par Na^+), serait lui-même électrogénique et engendrerait une réabsorption nette passive de cations dans la voie intercellulaire.

*
**

Ces transports ioniques à travers les cellules du segment de dilution sont assujettis à une régulation hormonale dont l'étude a été entreprise sur tubules isolés microperfusés *in vitro*. C'est ainsi que, sur la portion médullaire du segment de dilution de la souris, la vasopressine augmente la différence de potentiel transépithéliale électropositive et stimule les flux unidirectionnels de réabsorption des ions Cl^- et Na^+ . Cette action, dont le mécanisme exact reste à préciser, implique la production accrue d'AMP cyclique par les cellules de ce segment.

D'autre part, il a été observé chez le lapin que l'hormone parathyroïdienne stimule la réabsorption des ions calcium et magnésium par la portion corticale du segment de dilution, tandis que la calcitonine stimule la réabsorption du calcium dans sa portion médullaire. Ces observations sont en plein accord avec la présence d'une adénylate cyclase sensible à ces hormones dans les

mêmes portions de ce segment. Il n'est cependant pas encore établi expérimentalement si l'absorption du calcium, et son augmentation sous l'influence de ces hormones, résulte d'une diffusion passive le long de la voie extracellulaire, ou si une composante active, transcellulaire, est impliquée. Des arguments expérimentaux à l'appui de l'une ou l'autre de ces hypothèses ont été avancés, et l'éclaircissement de ce problème exige des recherches supplémentaires.

En conclusion, et malgré les points obscurs qui subsistent, il est évident que notre compréhension du fonctionnement à l'échelle cellulaire du segment de dilution a grandement progressé au cours des dernières années, grâce à la méthode de microperfusion tubulaire *in vitro*.

F. M.

*
**

Le cours a été complété par une série de 8 séminaires, portant cette année sur les sujets suivants :

Programme des séminaires :

22 janvier : M. Ph. CHAMPEIL : Etude cinétique par fluorimétrie de l'ATPase Calcium-dépendante du Reticulum sarcoplasmique.

29 janvier : M^{me} L. BANKIR : Caractéristiques structurales rénales dépendant de la présence d'hormone antidiurétique.

5 février : M. C. de ROUFFIGNAC : Effets de l'ADH sur la réabsorption des électrolytes par la branche large ascendante de l'anse de Henle.

19 février : M. G. BAVEREL : Conversion de l'alanine en glutamine par le cortex rénal du cobaye.

25 février : M^{lle} C. BAILLY : Effets du glucagon sur la réabsorption tubulaire chez le rat.

5 mars : M. R. MENGUAL : Mécanisme du transport du lactate sodium-dépendant dans des vésicules de bordure en brosse rénales.

12 mars : M^{lle} J. MARCHETTI : Le système kalicréine-kinine rénal.

M. F. ALVARADO : Mécanisme de cotransport des solutés organiques et du sodium à travers la bordure en brosse.

*
**

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

L'année 1982 aura correspondu à une réorganisation importante du laboratoire de Physiologie cellulaire. En effet, M. S. JARD, directeur de recherche à l'I.N.S.E.R.M., a été chargé de diriger le Centre de Pharmacologie-Endocrinologie créé à Montpellier conjointement par le C.N.R.S. et l'I.N.S.E.R.M. L'implantation à Montpellier de l'activité de S. JARD et J. BOCKAERT (actuellement sous-directeur du laboratoire de Physiologie cellulaire) ainsi que celle de la majorité de leurs collaborateurs, s'est échelonnée au cours du premier semestre de l'année courante. Cet essaimage entraînera une diminution notable des effectifs du laboratoire, et une reconcentration de nos activités scientifiques à venir autour du domaine de la physiologie cellulaire et rénale.

I. ÉQUIPE DE PHYSIOLOGIE RÉNALE

Comme nous l'avons précisé déjà dans nos précédents rapports d'activité, l'équipe de physiologie rénale s'est spécialisée dans l'étude de la segmentation fonctionnelle des différentes portions tubulaires du néphron, grâce à l'utilisation systématique de microméthodes permettant d'analyser leurs propriétés spécifiques sur des segments tubulaires uniques tels qu'on peut les obtenir par microdissection du rein. Un effort soutenu de mise au point méthodologique a été effectué en vue d'élargir l'éventail des informations expérimentales susceptibles d'être obtenues avec la résolution nécessaire. Nous passerons en revue rapidement les résultats ou les progrès obtenus cette année grâce à 5 approches expérimentales originales utilisées couramment ou en cours de développement au laboratoire.

1) Adénylate-cyclase hormone dépendante dans des segments isolés de néphron (D. CHABARDES, M. IMBERT-TEBOUL, M. MONTEGUT)

L'analyse systématique, faite au laboratoire depuis maintenant 7 ans, des sites d'action de 5 hormones peptidiques le long des segments successifs du néphron nous a amenés à poser le problème général de la régulation hormonale du fonctionnement rénal en termes nouveaux. Les résultats obtenus montrent en effet que la plupart des segments tubulaires contiennent une adénylate cyclase sensible à l'action de plusieurs hormones. Ceci est particulièrement manifeste dans le cas du rein de rat, dont le segment de dilution, dans sa portion corticale, répond à 5 hormones différentes. De plus, des expériences systématiques dans lesquelles deux hormones différentes ont été appliquées simultanément ont montré que leurs effets ne sont généralement pas additifs. Un tel résultat indique sans ambiguïté que les deux hormones tes-

tées stimulent un même « pool » d'enzyme, et donc agissent sur les mêmes cellules et devraient produire les mêmes effets biologiques via la formation intracellulaire de cAMP. Seuls deux segments tubulaires importants contiennent une adénylate cyclase sensible à une hormone seulement : le tubule contourné proximal, qui répond à l'hormone parathyroïdienne (PTH) et le tubule collecteur, qui répond à l'hormone antidiurétique (AVP).

Or, l'analyse des très nombreux travaux de physiologie rénale recherchant l'action de ce type d'hormone sur le rein du rat *in vivo* montre à l'évidence que deux effets hormonaux seulement sont bien établis chez cette espèce, à savoir l'action phosphaturiante de la PTH (qui se produit sur le tubule proximal) et l'action antidiurétique de l'AVP (qui se produit sur le tubule collecteur). D'autres effets de ces deux hormones, ou les effets physiologiques d'autres hormones qui stimulent l'adénylate cyclase rénale (calcitonine et glucagon par exemple) n'ont pas pu être établis de façon claire, reproductible et convaincante dans de telles études effectuées *in vivo*. Or, dans ce type de recherche endocrinologique, l'expérimentateur procède habituellement en deux temps : il abaisse ou supprime, d'abord (par une méthode appropriée) l'hormone qui l'intéresse du sang circulant (périodes témoins), puis il perfuse cette hormone aux doses requises (périodes expérimentales). L'effet de l'hormone sur le rein est jugé par la différence qualitative et quantitative de la composition de l'urine émise entre périodes expérimentales et périodes témoins. Compte tenu de ce que nous savons aujourd'hui sur la distribution des sites d'actions des hormones le long du néphron, et qui a été résumé ci-dessus, on comprendra que cette méthode expérimentale ait permis de mettre en évidence des effets hormonaux nets et reproductibles pour ces seuls segments tubulaires dont l'adénylate cyclase n'est sensible qu'à une seule hormone (tubule proximal et tubule collecteur). Mais pour les autres segments tubulaires, sur chacun desquels plusieurs hormones sont capables de produire une même réponse physiologique, on conçoit que la suppression puis l'administration de l'une seule d'entre elles soit évidemment insuffisante pour observer cette réponse si les autres hormones actives sont présentes pendant toute l'expérience. Par contre, nous avons suggéré que si toutes les hormones actives sur un segment donné pouvaient être expérimentalement abaissées dans le plasma, alors la seule administration ultérieure de l'une ou l'autre d'entre elles devrait permettre d'observer des effets nets, reproductibles et similaires. Des expériences de ce type particulier, utilisant la méthode des microponctions tubulaires *in vivo*, ont été récemment entreprises chez le rat par deux équipes parisiennes, celle de C. de ROUFFIGNAC et celle de C. AMIEL. Les sécrétions endogènes d'AVP, de PTH, de calcitonine et de glucagon sont d'abord supprimées (ou très abaissées) chez ces animaux, puis l'une ou l'autre de ces hormones est perfusée. Les résultats d'ores et déjà obtenus avec l'AVP, le glucagon et la calcitonine montrent sans équivoque que chacune de ces hormones, dans de telles conditions expérimentales, sti-

mule fortement la réabsorption des ions Mg^{++} et Ca^{++} par le segment de dilution. Ces observations vérifient donc expérimentalement *in vivo* les prédictions tirées des études biochimiques faites *in vitro* et les complètent en leur donnant leur dimension physiologique.

D'autre part, et en collaboration avec K. BADDOURI, de la Faculté des Sciences de l'Université de Rabbat, une étude a été effectuée sur le rein de la gerboise (*Jaculus orientalis*). Il a été observé chez cette espèce désertique que la concentration habituelle de la vasopressine dans le sang dépasse celle mesurée chez le rat de plus de deux ordres de grandeur (400 à 600 pgr/ml). La possibilité d'une « désensibilisation » physiologique des récepteurs de la vasopressine en présence de concentrations hormonales aussi élevées méritait d'être examinée. Deux groupes de 5 gerboises ont été étudiés. L'un des groupes a été soumis pendant 4 à 6 semaines à un régime sec sans apport d'eau, l'autre à un régime fortement hydraté. Les résultats obtenus montrent, chez les animaux hydratés par rapport aux deshydratés : a) une augmentation du nombre des récepteurs vasopressiniques dans le foie et antidiurétiques dans le rein, sans changement d'affinité (capacité de liaison de la [3H]LVP augmentée, K_D de liaison inchangé) ; b) une augmentation de la réponse de l'adénylate cyclase rénale pour la vasopressine, mais non pour le glucagon ; c) cette augmentation touche surtout le segment de dilution du néphron et à un moindre degré le tubule collecteur ; d) en corrélation avec ces résultats, la concentration d'AVP circulante est abaissée chez les animaux hydratés, ainsi que la pression osmotique de l'urine émise. L'ensemble de ces observations est compatible avec l'hypothèse que le nombre des récepteurs rénaux et hépatiques à la vasopressine peut être physiologiquement contrôlé par le taux d'hormone circulante chez cette espèce (« down » regulation).

2) Production endogène d'AMP cyclique par des segments tubulaires en survie *in vitro* et sa régulation (D. CHABARDÈS, M. IMBERT-TEBOUL, M. MONTEGUT)

La microméthode de mesure de l'AMP cyclique intracellulaire par radio-immuno-essai mise au point précédemment (cf. notre rapport de 1981) a été utilisée pour rechercher la présence et étudier les propriétés de récepteurs α adrénérgiques éventuels dans le tubule collecteur médullaire du rein de rat. L'addition de Nor-adrénaline (10^{-7} à $10^{-5}M$) au milieu d'incubation inhibe fortement (d'environ 80 p. 100) la production de cAMP induite par la vasopressine. Cet effet inhibiteur se produit via des récepteurs adrénérgiques α_2 ; il s'exerce sur la synthèse et non la dégradation du cAMP puisqu'il se produit en présence d'inhibiteurs des phosphodiesterases. Il affecte donc l'activité de l'adénylate cyclase elle-même, mais probablement par un mécanisme indirect qui exige l'intégrité cellulaire, puisqu'il n'est pas observé lorsque l'activité de l'adényl cyclase stimulée par la vasopressine est mesurée sur des

tubules collecteurs dont les membranes cellulaires ont été rompues par congélation. Enfin, cette action inhibitrice des agonistes α adrénérgiques ne s'exerce pas vis-à-vis de l'AMP cyclique produit en réponse au glucagon sur ce même segment tubulaire, ce qui suggère que vasopressine et glucagon stimulent l'adénylate cyclase présente dans deux types cellulaires différents (cellules principales pour l'une, cellules intercalaires pour l'autre).

3) *Production métabolique de CO_2 par des segments tubulaires en survie in vitro* (F. LE BOUFFANT, A. HUS-CITHAREL, F. MOREL)

Des segments tubulaires individuels (0,2 à 0,5 mm) sont incubés dans 1 μ l de milieu essentiel minimum sans bicarbonate (tampon Hepes) dont l'un ou l'autre des substrats organiques est marqué uniformément par ^{14}C ; le $^{14}CO_2$ métabolique formé est recueilli dans KOH par périodes successives de 30 minutes. L'influence de divers facteurs et paramètres expérimentaux a été systématiquement étudiée sur plusieurs segments des néphrons du rat : tubule proximal, tubule collecteur, portion médullaire du segment de dilution (MAL) et surtout portion corticale du segment de dilution (CAL). Les principaux résultats acquis indiquent que :

a) Le segment proximal oxyde peu le glucose, alors que la glycolyse aéro-bique est intense dans les segments distaux du néphron.

b) Les portions corticale et médullaire du segment de dilution utilisent le lactate préférentiellement au glucose lorsque ces deux substrats sont présents simultanément dans le milieu (l'un ou l'autre étant marqué).

c) A l'inverse, le tubule collecteur utilise le glucose préférentiellement au lactate dans les mêmes conditions expérimentales.

d) Lorsque la lumière tubulaire du CAL ou du MAL est ouverte, une fraction importante de la production de $^{14}CO_2$ à partir de ^{14}C -lactate (50 à 80 p. 100) est couplée au transport actif de sodium au travers des cellules épithéliales, comme l'atteste une inhibition importante et comparable du métabolisme oxydatif produite soit par l'ouabaine (inhibition de la composante active du transport de Na^+ par la $[Na^+-K]ATPase$) soit par le furosémide (inhibition de la pénétration du sodium par la face apicale des cellules).

e) Lorsque la pression osmotique du milieu d'incubation est augmentée par l'addition de mannitol, on observe un métabolisme oxydatif maximum pour 400 mOsm/l dans le cas du CAL et pour 500 mOsm/l dans le cas du MAL.

Ces diverses observations préliminaires démontrent que les cellules épithéliales de chaque segment tubulaire possèdent des spécificités concernant non seulement leurs propriétés de perméabilité et de transport ionique et leurs propriétés de reconnaissance hormonale, mais aussi leur métabolisme énergétique.

4) *Activité [Na-K]ATPasique de segments isolés des néphrons* (A. DOUCET, G. EL MERNISSI)

L'étude de la régulation *in vivo* de l'activité [Na-K]ATPasique rénale sous l'influence de minéralocorticoïdes surrenaliens a été poursuivie et approfondie chez le rat et le lapin. Il est clair, chez ces deux espèces, que la surrenalectomie diminue — et que l'administration d'aldostérone en dose physiologique restaure en 3 heures — l'activité [Na-K]ATPasique principalement dans l'un des segments du néphron, à savoir, le tubule collecteur.

5) *Localisation des sites de production de la kallibréine le long des néphrons* (J. MARCHETTI, M. IMBERT-TEBOUL)

On sait que la kallibréine est une enzyme produite par le rein et excrétée dans l'urine. Grâce à un radioimmuno-essai spécifique de la bradykinine (produite à partir de kininogènes appropriés en présence de l'enzyme), les sites de production de la kallibréine ont été recherchés sur des segments de néphron de lapin isolés par microdissection. Seul, le tubule connecteur (DCT_g et CCT_g) présente une activité kininogénique élevée, à l'exclusion des autres segments du néphron. L'administration de DOCA *in vivo* pendant plusieurs jours augmente le contenu du tubule connecteur en kallibréine.

6) *Mesure de la concentration intracellulaire des ions Na^+ et K^+ dans des segments tubulaires incubés in vitro* (J. SUDO et F. MOREL)

La possibilité de mesurer en routine, avec la précision et la sensibilité requises, le contenu intracellulaire en ions et potassium représente, à l'évidence, une exigence nécessaire dans toute étude des propriétés de perméabilité et de transport des cellules épithéliales en survie *in vitro*. Nous nous sommes donc attachés à mettre au point une méthode qui soit applicable à des fragments uniques tubulaires de rein obtenus par microdissection. Les deux difficultés principales à surmonter étaient les suivantes : a) éliminer complètement le sodium extracellulaire dans des conditions qui n'entraînent pas de perte notable de sodium intracellulaire et b) disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour mesurer de l'ordre de quelques 10^{-12} Equivalents de sodium avec une bonne précision (0,5 mm de tubule correspondent à un volume cellulaire de 0,3 nl environ, soient 3 picoEqu de Na intracellulaire par échantillon). La première difficulté a été surmontée en rinçant rapidement les fragments tubulaires, préalablement incubés dans les conditions choisies, dans 3 bains successifs d'une solution glacée de chlorure de choline. Un microspectrophotomètre d'émission de flamme avec intégration de signal, spécialement construit à Saclay pour ce type d'application, a

permis de surmonter le problème analytique mentionné (l'appareil nécessite quelques nanolitres de solution par échantillon).

Les mesures effectuées jusqu'ici (sur des tubules collecteurs) en utilisant cette méthode ont procuré des résultats en accord avec les valeurs connues pour d'autres types cellulaires (90 à 100 mEq par litre de volume cellulaire pour le potassium et environ 15 mEq/l pour le sodium après incubation des tubules à 30° ou 37°). Le rapport Na/K est inversé si les tubes ont été incubés à 4 °C.

II. ÉTUDE DES RÉCEPTEURS AUX NEUROMÉDIATEURS

(J. BOCKAERT, M. LUCAS, C. EBERSOLT, J.-P. MAUGER, J. PREMONT et V. HOMBURGER)

Les récepteurs β -adrénergiques des cellules gliales C₆

De nombreux tissus contiennent à la fois des récepteurs β_1 et β_2 adrénérgiques. Le problème que nous nous sommes posé est de savoir si cette hétérogénéité correspond à une hétérogénéité cellulaire ou si les récepteurs β_1 et β_2 adrénérgiques peuvent coexister dans une même cellule. Nous avons étudié plusieurs sous clones des cellules gliales C₆. Par des mesures de liaison et par l'analyse de l'activation de l'adényl-cyclase, nous avons pu montrer que les récepteurs β_1 et β_2 coexistaient sur la même cellule. Les études de couplage récepteur-adényl-cyclase montrent que la spécificité d'un agoniste β_1 ou β_2 réside à la fois dans son affinité pour ces récepteurs et dans l'efficacité du couplage. Nous avons précédemment montré que la relation de couplage entre le récepteur β -adrénérgique et l'activation de l'adényl-cyclase est de type michaelien. L'affinité apparente du complexe [HR] pour l'enzyme à l'équilibre (K) est égale à 0,35 [RT]. Dans un modèle de « collision coupling » cette constante doit être égale au rapport entre la constante de désactivation de l'enzyme (k_{off}) et la constante d'activation du système (k_a). Nous avons mesuré ces constantes de façon indépendante et montré que $k_a = 11,1 \pm 0,8$ [RT]⁻¹ min⁻¹ et $k_{off} = 4,8 \pm 0,1$ min⁻¹. Le rapport de ces constantes 0,43 RT est voisin de celui déterminé à l'équilibre suggérant que le modèle de « collision coupling » est valable. Durant la désensibilisation, il y a une modification de la constante K qui résulte à la fois en une altération de k_{off} et de k_a . L'altération du k_{off} pourrait rendre compte de la désensibilisation hétérologue, alors que l'altération de k_a serait spécifique de la désensibilisation homologue.

Nous avons poursuivi notre recherche d'un ligand irréversible du récepteur β -adrénérgique. Un dérivé nitrophényl éther du propanolol a été préparé. Il permet le blocage de 62 % des récepteurs β -adrénérgiques après irradiation

sans affecter l'adényl-cyclase de base ni sa réponse au fluorure ou au Gpp (NHp). Il peut être utilisé sur des cellules intactes. Un dérivé bromé du pindolol a également été préparé. Il permet de bloquer de façon irréversible 85 à 90 % des récepteurs β -adrénergiques. Nous envisageons de l'utiliser pour étudier le « turn-over » du récepteur β -adrénergique.

Les récepteurs α_1 -adrénergiques et leur métabolisme des cellules musculaires lisses en culture

Les cellules BC₃H₁ possèdent des récepteurs α_1 adrénergiques que l'on peut caractériser avec un puissant antagoniste, le Prazosin tritié. Le nombre de sites récepteurs sur ces cellules est d'environ 20 000. Après un blocage total et irréversible de ces récepteurs avec la phenoxybenzamine, la cinétique de réapparition hyperbolique des récepteurs α_1 adrénergiques permet de calculer la constante de dégradation ($k = 0,03 \text{ h}^{-1}$) et la vitesse de production des récepteurs ($r = 3,2 \text{ fmoles/mg/h}$) ce qui correspond à la synthèse d'environ 760 récepteurs/cellule/heure. La demi-vie du récepteur est de l'ordre de 23 h. La possibilité de mesurer à la fois la vitesse de synthèse et la vitesse de dégradation de ce récepteur devrait permettre d'analyser sous un jour nouveau le problème de modulation du nombre de récepteurs.

Nous étudions actuellement le turnover des récepteurs α_1 adrénergiques *in vivo* chez le rat afin de savoir si l'environnement hormonal a une influence importante. De plus, nous essayons de comparer les propriétés du récepteur α_1 adrénergique sur des cellules intactes et sur des membranes. Des expériences préliminaires montrent que les états d'affinité de ce récepteur pour les agonistes sont très différents sur membrane ou sur cellule.

Localisation neuronale et gliale des récepteurs aux neuromédiateurs

Les cellules gliales primaires dépourvues de neurones contiennent un grand nombre de récepteurs aux neuromédiateurs. Nous avons déjà mis en évidence des récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques, nous avons cette année analysé les récepteurs α_1 et α_2 adrénergiques. Ils ont des propriétés similaires à celles détectées dans le système nerveux central. En particulier, les récepteurs α_2 adrénergiques sont modulés allostériquement par le Na⁺ et le GTP. Ces cellules possèdent également des récepteurs à l'adénosine de type A₁ et A₂. Le rôle de ces récepteurs est pratiquement inconnu. Nous envisageons d'étudier leur rôle dans le métabolisme du glycogène et la neoglucogénèse.

Les cellules gliales ne possèdent pas de récepteurs dopaminergiques et sérotoninergiques couplés à une adényl-cyclase.

Les neurones en culture primaire du striatum contiennent au contraire des récepteurs dopaminergiques et sérotoninergiques. Ils contiennent également

des récepteurs β_1 adrénergiques et purinergiques (A_1 et A_2). Ces modèles pourront, nous l'espérons, contribuer à l'étude du mécanisme d'action de ces neurotransmetteurs au niveau cellulaire.

Rôle de l'AMP cyclique dans la transmission synaptique

En collaboration avec le D^r GERSCHENFELD, nous avons entrepris un travail, afin de démontrer que l'AMP cyclique peut induire des changements de perméabilité au niveau neuronal. Dans un certain nombre de neurones d'escargots (*Helix aspersa*), la sérotonine et la dopamine induisent une diminution de la perméabilité au K^+ qui est voltage-dépendante. Ces effets sont reproduits par l'injection intracellulaire d'AMP cyclique. Les inhibitions de phosphodiésterases potentialisent les effets de la sérotonine et de la dopamine. De plus, la forskoline, un activateur de l'adényl-cyclase, reproduit les effets de la sérotonine. Nous avons étudié les caractéristiques pharmacologiques des récepteurs sérotoninergiques et dopaminergiques couplés à une adényl-cyclase des neurones d'escargots. Nous avons pu mettre au point, grâce à la collaboration de l'équipe du D^r MOREL, une méthode permettant de mesurer sur un seul neurone l'activation de l'adényl-cyclase par la sérotonine et la dopamine. Il est clair que les neurones qui présentent une réponse électrophysiologique à la sérotonine, à la dopamine, ainsi qu'à l'injection intracellulaire d'AMP cyclique, possèdent aussi une adényl-cyclase sensible à ces neuromédiateurs. Au contraire, les cellules ne possédant pas les réponses électrophysiologiques, ne possèdent pas ces enzymes.

Les réponses adényl-cyclasiques à la dopamine et à la sérotonine sont additives sur un seul neurone. Ceci implique que 1) soit la qualité d'adényl-cyclase n'est pas le facteur limitant ; 2) soit les récepteurs dopaminergiques et sérotoninergiques sont localisés dans des domaines différents de la membrane.

Il est aussi intéressant de souligner que les réponses électrophysiologiques à la dopamine et à la sérotonine ne sont pas additives. Ceci suggère qu'un facteur limitant de la réponse intervient après la formation d'AMP cyclique. Nous envisageons d'injecter de l'ATP α P^{32} dans ces neurones afin de déterminer si des phosphorylations de protéines membranaires pouvant correspondre à des canaux K^+ sont détectables.

Caractéristiques des récepteurs D_2 et D_1 couplés à l'adényl-cyclase

Nous avons récemment entrepris l'étude de la modulation du récepteur dopaminergique D_1 du cortex frontal de rat.

Ce récepteur, lorsqu'il est occupé par la dopamine, stimule une adényl-cyclase spécifique. Des lésions électrolytiques bilatérales des neurones dopa-

minergiques innervant le cortex frontal (neurones A_{10}), produisent des hypersensibilités du récepteur dopaminergique et une baisse de 90 % du contenu en dopamine de cette région. Ces lésions ne produisent pas de baisse significative de la noradrénaline. Des lésions des mêmes neurones (A_{10}) à l'aide de 6 hydroxydopamine, produisent une baisse de dopamine équivalente à celle produite par des lésions électrolytiques. Cependant, on n'observe pas d'hypersensibilité significative de l'adényl-cyclase du cortex frontal. Ces lésions chimiques s'accompagnent d'une baisse de 96 % de la noradrénaline. Il semble donc que l'absence d'innervation dopaminergique ne soit pas seule responsable de l'hypersensibilité. La destruction simultanée de la noradrénaline semble bloquer l'hypersensibilité. On ne peut exclure que les lésions électrolytiques ont également modifié l'innervation du cortex frontal par d'autres neuromédiateurs.

Les récepteurs dopaminergiques D_2 ont une spécificité différente des récepteurs D_1 , en particulier ils ont une meilleure affinité pour les neuroleptiques du type butyrophenone. Jusque très récemment, on pensait que ces récepteurs n'étaient pas couplés à une adényl-cyclase. Cependant, nous avons montré que dans l'hypophyse, le récepteur dopaminergique impliqué dans l'inhibition de la libération de prolactine est capable d'inhiber l'adényl-cyclase de l'adénohypophyse. Les caractéristiques pharmacologiques de ce récepteur sont à l'étude. Il semble bien qu'il soit de type D_2 . Nous poursuivons cette étude en espérant pouvoir montrer que dans le système nerveux central, le récepteur D_2 est également capable d'inhiber l'adényl-cyclase. De plus, l'influence des conditions hormonales (œstrogènes, corticoïdes...) sur l'effet dopaminergique D_2 de l'hypophyse sera analysé.

III. ÉQUIPE D'ENDOCRINOLOGIE MOLÉCULAIRE

(S. JARD, D. BUTLEN, B. CANTAU, G. GUILLON, C. ROY)

L'année écoulée a été marquée par la préparation du transfert de l'équipe dans sa nouvelle implantation au Centre de Pharmacologie-Endocrinologie récemment créé par le C.N.R.S. et l'I.N.S.E.R.M. à Montpellier. Les activités poursuivies au Collège de France ont porté sur 5 thèmes principaux.

1) *Isorécepteurs de la vasopressine*

Les méthodes de culture des myocytes de la paroi artérielle et des cellules mésangiales du glomérule rénal ont été affinées. Il a été observé en particulier que les récepteurs membranaires de la vasopressine et de l'angiotensine demeurent exprimés dans des cultures secondaires. Les méthodes permettant sur ce matériel biologique de quantifier des paramètres directement liés à la

réponse contractile (difficilement mesurable de manière directe sur des cellules isolées en culture) sont en cours de mise au point.

Les études menées parallèlement sur les myocytes en culture, les hépatocytes isolés et des membranes rénales ont permis de définir les bases d'une définition pharmacologique d'isorecepteurs de la vasopressine (récepteurs V_1 et V_2). Ces études seront étendues à d'autres structures cible de la vasopressine. Le but du programme développé est de définir à terme le nombre de gènes codant pour des récepteurs de la vasopressine.

2) Récepteurs de l'angiotensine

Dans la ligne des études réalisées sur le récepteur hépatique de l'angiotensine, une étude est menée en collaboration avec l'équipe de J. SAEZ (Lyon) sur les récepteurs surrenaliens de l'angiotensine. Le but de ce travail est une caractérisation directe sur des populations homogènes de cellules (cellules de zones glomérulées et fasciculées) des récepteurs de l'angiotensine. Un ensemble de données physiologiques et pharmacologiques suggèrent l'existence de récepteurs de l'angiotensine différents du point de vue de leur spécificité de reconnaissance et de leur mécanisme d'action.

Peu d'études ont été effectuées à ce jour. Les études d'ores et déjà réalisées sur des fractions membranaires de surrenale bovine établissent sans ambiguïté l'existence de différences importantes entre les récepteurs surrenaliens et hépatiques de l'angiotensine.

3) Régulation de la sensibilité à la vasopressine des structures cible de l'hormone

Deux modèles ont été étudiés. La gerboise présentant une hypervasopressine chronique, et le mutant OB/OB de la souris.

Les études sur la gerboise ont permis de montrer que le récepteur hépatique de la vasopressine (de type V_1 non couplé à l'adénylate cyclase) peut être l'objet comme nous l'avions antérieurement montré dans le cas du récepteur rénal (de type V_2 , couplé à l'adénylate cyclase) d'une désensibilisation consécutive à une exposition à des concentrations élevées d'hormone. La demi-vie apparente du récepteur hépatique est de 3 à 4 fois plus élevée que la demi-vie du récepteur rénal. Chez la souris obèse OB/OB, la vasopressine est dépourvue d'effet glycogénolytique sur l'hépatocyte isolé. Cette absence de réponse a pour origine vraisemblable une disparition quasi complète des récepteurs hépatiques de l'hormone. Il est intéressant de noter que parallèlement le nombre des récepteurs rénaux n'est que très partiellement diminué.

4) *Etudes sur les cellules rénales en culture*

L'analyse cinétique de la liaison de vasopressine tritiée sur les cellules rénales LLC-PK1 a été poursuivie. Les résultats obtenus confirment la validité du modèle antérieurement décrit selon lequel le récepteur de la vasopressine est de nature polymérique, et comporte plusieurs sites de liaison de la vasopressine : l'occupation d'un site entraînant une transition d'affinité des sites libres. Cette analyse suggère également que seule la forme entièrement saturée du récepteur peut être l'objet d'une internalisation. Entretienues dans un milieu sans sérum, les cellules LLC-PK1 n'expriment qu'un nombre très limité de récepteurs de la vasopressine. L'addition d'un mélange de 12 effecteurs comportant un ensemble d'hormones et de vitamines permet de multiplier par un facteur de 20 à 30 le nombre des récepteurs de la vasopressine. Il est intéressant de noter que ce traitement ne modifie pas la sensibilité des cellules à la calcitonine et diminue leur sensibilité aux agonistes bêta adrénergiques.

Enfin il a été montré que l'adénosine exerce un double effet sur l'adénylate cyclase des cellules LLC-PK1 : 1) un effet inhibiteur produit par les concentrations les plus faibles d'adénosine et s'exerçant sur l'activité de base et l'activité stimulée par la vasopressine ; 2) un effet activateur produit par des concentrations plus élevées. Seul l'effet activateur est l'objet d'un phénomène de désensibilisation consécutif à l'exposition chronique des cellules à un agoniste purinergique.

5) *Formes moléculaires des récepteurs rénaux et hépatiques de la vasopressine*

Il avait été antérieurement établi que les complexes vasopressine-récepteur rénaux peuvent être solubilisés et partiellement purifiés sous deux formes moléculaires principales, une forme lourde (160-170 K) et une forme légère (80 K). La forme lourde de haute affinité pour l'hormone est sensible à l'action du GTP alors que la forme légère ne l'est pas.

La cinétique de conversion de la forme légère en forme lourde a été étudiée. Il a été montré également que la conversion de la forme légère en forme lourde est ralentie en présence de NaF ou de glucagon. Ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle la forme lourde du complexe pourrait résulter d'une association du récepteur avec une sous-unité de la protéine de couplage site d'action du GTP. L'effet du glucagon et du fluorure sur l'adénylate cyclase implique une participation de la protéine de couplage. Leur action sur l'interconversion des deux formes du récepteur de la vasopressine peut être interprétée simplement comme la conséquence d'une diminution du nombre des molécules de protéine de couplage disponibles pour une interaction avec les complexes vasopressine-récepteur.

Deux formes moléculaires (lourde et légère) du récepteur hépatique de la vasopressine (non couplé à l'adénylate cyclase) peuvent également être mises en évidence. Il est possible (par analogie avec les résultats obtenus avec le récepteur rénal couplé à l'adénylate cyclase) que la forme lourde représente un complexe entre l'hormone, le récepteur et un facteur de couplage dont la nature demeure encore hypothétique.

PUBLICATIONS

F. MOREL, D. CHABARDÈS et M. IMBERT-TEBOUL, *Les sites d'action de la vasopressine dans le rein (J. Physiol., Paris, 77, 615-620, 1981).*

F. MOREL, D. CHABARDÈS, M. IMBERT-TEBOUL, F. LE BOUFFANT, A. HUS-CITHAREL and M. MONTEGUT, *Multiple hormonal control of adenylate cyclase in distal segments of the rat kidney (Kidney Int., 21, Suppl. 11, S-55-S-62, 1982).*

A. DOUCET, D. CHABARDÈS, M. IMBERT-TEBOUL, A.I. KATZ and F. MOREL, *Enzyme activity measurement in single nephron segments as an approach to physiological problems (Proc. 8th Int. Cong. Nephrol., Athens, W10, June 1981, 958-964).*

F. LE BOUFFANT, A. HUS-CITHAREL and F. MOREL, *In vitro $^{14}\text{CO}_2$ production by single pieces of rat cortical thick ascending limbs and its coupling to active salt transport (6th Intern. Sympos. on Biochem. of Kidney Functions, Le Bischenberg, Dec. 7-10, 1981, Ed. F. MOREL, Elsevier N.H. Publ., 363-370, 1982 I.N.S.E.R.M. Symp N° 21).*

G. EL MERNISSI and A. DOUCET, *Sites and mechanism of mineralocorticoids action along the rabbit nephron (Ibid., 269-276).*

F. MOREL, *Mechanism and sites of hormone action in kidney tubules (Quarterly J. Exp. Physiol., 67, part 3, 387-391, 1982).*

J. BOCKAERT, *General characteristics, localization and adaptative responsiveness of neurotransmitter-sensitive adenylate cyclases in the central nervous system (Advances in Cyclic Nucleotide Research, 14, 611-628, 1981).*

V. HOMBURGER, M. LUCAS and J. BOCKAERT, *Loss of β adrenergic receptors and changes in their coupling with the adenylate cyclase during agonist desensitization in C_6 glioma cells (The Fourth Intern. Symp. of Taniguchi Foundation, in press).*

J. BOCKAERT, D.L. NELSON, A. HERBET, J. ADRIEN, A. ENJELBERT and M. HAMON, *Serotonin-receptors coupled with an adenylate cyclase in the rat*

brain. Non identity with ^3H -5-HT binding sites (In *Serotonin, current aspects of neurochemistry and function*, Haber et al., Eds, Plenum Publishing Corporation, New York, 1981).

J.P. TASSIN, H. SIMON, J. GLOWINSKI and J. BOCKAERT, *Denervation supersensitivity of cortical dopaminergic receptors in VTA-lesioned hyperactive rats (Abstracts of the XIIth Congress of the International Soc. of Psychoneuroendocrinology, 1981).*

J. BOCKAERT, J. PREMONT, J.P. TASSIN, M. HAMON, P. DETERRE, C. EBERSOLT and A. PROCHIANTZ, *Pharmacological characteristics and neuronal localization of dopamine and serotonin-sensitive adenylate cyclases in rat brain and snail neurones (Hormones and Cell Regulation, Vol. 6, J.E. Dumont, J. Nunez and G. Schultz eds., Elsevier Biomedical Press, 155-166, 1982).*

P. DETERRE, D. PAUPARDIN-TRITSCH, J. BOCKAERT and H.M. GERSCHENFELD, *Role of cAMP in a serotonin evoked slow inward current in snail neurons (Nature, 290, 783-785, 1981).*

J.-P. MAUGER, G. VASSENT and J. BOCKAERT, *High and low affinity states of β adrenergic receptors and their coupling with the adenylate cyclase in a muscle cell line (FEBS Letters, 127, N° 2, 267-272, 1981).*

C. EBERSOLT, M. PEREZ and J. BOCKAERT, *α_1 and α_2 adrenergic receptors in mouse brain astrocytes from primary cultures (J. of Neurosciences Res., 6, 643-652, 1981).*

V. HOMBURGER, M. LUCAS, E. ROSENBAUM, G. VASSENT and J. BOCKAERT, *Presence of both β_1 and β_2 adrenergic receptors in a single cell type (Mol. Pharmacol., 20, 463-469, 1982).*

J.-P. MAUGER, F. SLADACEK and J. BOCKAERT, *Characteristics and metabolism of α_1 adrenergic receptors in a nonfusing muscle cell line (J. of Biol. Chem., N° 2, 875-879, 1982).*

Y. TORRENS, R. MICHELOT, J.-C. BEAUJOUAN, J. GLOWINSKI and J. BOCKAERT, *In vivo biosynthesis of ^{35}S -substance P from ^{35}S -methionine in the rat striatum and its transport to the substantia nigra (J. Neurochem., in press).*

J.-P. TASSIN, H. SIMON, D. HERVE, G. BLANC, M. LEMOAL, J. GLOWINSKI and J. BOCKAERT, *Non-dopaminergic fibres may regulate dopamine-sensitive adenylate cyclase in the prefrontal cortex and nucleus accumbens (Nature, 295, 696-698, 1982).*

H. GOZLAN, V. HOMBURGER, M. LUCAS and J. BOCKAERT, *Photoaffinity labelling of β adrenergic receptors of C_6 glioma cells. Presence of a nucleophilic group in the receptor (Biochem. Pharmacol., in press).*

V. HOMBURGER, M. LUCAS and J. BOCKAERT, *Turn on and turn off reactions of β -adrenergic-sensitive adenylylase in control and desensitized C₆ glioma cells* (*FEBS Letters*, 141, N° 2, 245-250, 1982).

S. JARD, *Transduction of hormonal signals through the membrane* (in : « Cours de l'Ecole de Physique Théorique des Houches », Balia Ed., North-Holland, Publishing Company, 1980).

G. GUILLON, B. CANTAU and S. JARD, *Effects of thiol-protecting reagents on the size of solubilized adenylylase and on its ability to be stimulated by guanyl nucleotides and fluoride* (*Eur. J. Biochem.*, 117, 401-406, 1981).

S. JARD, *Les isorécepteurs de la vasopressine dans le foie et dans le rein : relation entre fixation d'hormone et réponse biologique* (*J. Physiol.*, 77, 621-628, 1981).

C. ROY, *Cell culture as means to study vasopressin receptors regulation* (in : « Biochemical aspects of renal function », 1981).

S. JARD, P. CLAUSER, R. BONO and B. CANTAU, *Effects of GTP on vasopressin and angiotensin binding to rat liver membranes* (*Protides of the Biological Fluids*, H. Peeters ed., 29, 517-520, 1981).

R.M. RAJERISON, D. BUTLEN and S. JARD, *Ontogenic development of kidney and liver vasopressin receptors* (In : « The Kidney during development », A. Spitzer ed., Masson Publishing U.S.A., 249-256, 1982).

G. GUILLON, D. BUTLEN, B. CANTAU, *Kinetic and pharmacological characterization of vasopressin membrane receptors from human kidney medulla : relation to adenylylase activation* (*Eur. J. Pharm.*, in press).

J. PENIT, M. FAURE and S. JARD, *Vasopressin and angiotensin II receptors in rat aorta smooth muscle cells in culture* (*Amer. J. Physiol.*, in press).

MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS SUR INVITATION

M. François MOREL a été invité comme Visiting Scientist au « Mount Desert Island Biological Laboratory » (Maine, U.S.A.) en juillet 1981. Il a fait des exposés sur invitation au Symposium International sur « Molecular Basis of Tubular Transport and of the Action of Diuretics » (Bonn, octobre 1981) et au Symposium sur « Hormonal Control of Sodium Excretion » de la Physiological Society (Londres, novembre 1981). Il a présenté des Séminaires et des Conférences au NIH (Bethesda, U.S.A.), en juillet 1981 et avril 1982, ainsi que dans les Universités de Floride (Gainesville, U.S.A.) en avril 1982 et de Mexico, en avril 1982. D'autre part, il a été l'organisateur

du 6° Symposium International sur la « Biochimie des Fonctions rénales », qui s'est tenu au Bischenberg, près de Strasbourg, du 7 au 10 décembre 1981 et l'éditeur du Volume correspondant, publié en mars 1982, par Elsevier N.-H.

M^{lle} Danielle CHABARDÈS effectue depuis le 1^{er} janvier 1982 un stage d'un an dans le Laboratoire du Docteur M. BURG (N.I.H., à Bethesda).

M. Joël BOCKAERT a fait une Conférence sur invitation au 6° Symposium européen « on Hormones and Cell regulation » de l'I.N.S.E.R.M. (Strasbourg) et une Communication à Liège à la Réunion de l'Association européenne de Neurobiologie.

DIPLOMES ET PROMOTIONS

M. Jean-Pierre MAUGER a passé sa Thèse d'Etat ès Sciences.

M^{me} Pascale CLAUSER a passé une Thèse de 3° Cycle.

ÉQUIPE RATTACHÉE AU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

RAPPORT D'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

Juin 1981 - Juin 1982

Les recherches du groupe de Neuroendocrinologie Cellulaire se sont poursuivies selon les deux thèmes développés parallèlement au laboratoire.

I. RÉGULATION DE LA SÉCRÉTION DE PROLACTINE PAR DES LIGNÉES DE CELLULES ANTÉHYPOPHYSAIRES (GH3)

Les résultats effectivement publiés au cours de l'année concernent trois aspects de nos recherches dans ce domaine.

Un progrès technique important obtenu précédemment en immunocytochimie ultrastructurale a permis pour la première fois de visualiser la prolactine à l'intérieur des différents compartiments du reticulum endoplasmique des cellules GH3 (reticulum rugueux, reticulum lisse golgien). Il a été alors

possible de suivre le déplacement de la prolactine au sein du reticulum endoplasmique en fonction du temps, après l'exposition des cellules à un neuro-peptide, le TRH, dont nous avons montré auparavant qu'il stimule de façon biphasique la sécrétion de prolactine. On constate que dans un premier temps le TRH entraîne une déplétion du contenu en prolactine du reticulum. Cette phase est contemporaine de la libération d'un pool préformé d'hormones. Elle est suivie dans l'heure suivante d'une recharge importante des deux compartiments du reticulum, marquant le début de la phase de resynthèse de la prolactine. Cette phase de recharge est effectivement inhibée en présence de cycloheximide. Cette étude révèle, en outre, l'existence d'un compartiment cytoplasmique de matériel possédant une immunoréactivité de type prolactine, mais non mobilisable par le TRH (C. TOUGARD).

Les recherches relatives aux mécanismes possibles de l'« internalisation » du TRH dans les cellules GH3 se sont poursuivies. On a étudié la cinétique du transfert du TRH au noyau et constaté que celui-ci est très rapide : le matériel radioactif accède au noyau déjà après 5 min à 37 °C et ceci quelle que soit la méthode utilisée, autoradiographie ou fractionnement cellulaire. L'intervention possible dans ce phénomène de l'endocytose de récepteurs membranaires a été testée par deux approches. L'abaissement de la température à 4 °C, condition dans laquelle l'endocytose est bloquée, n'empêche pas le transfert rapide du TRH au noyau, quand celui-ci est apprécié par autoradiographie. Cependant, après fractionnement subcellulaire, la radioactivité associée aux noyaux est négligeable, ce qui suggère que le TRH transféré à 4 °C se lie de façon stable à un éventuel récepteur, selon un mécanisme dépendant de la température. La chloroquine, agent lysosomotrope, n'affecte ni la liaison, ni l'internalisation du TRH dans les cellules GH3, ce qui apporte un nouvel argument indirect contre l'intervention de l'endocytose dans l'« internalisation » du TRH (J.N. LAVERRIÈRE, D. GOURDJI, A. TIXIER-VIDAL).

L'étude du mécanisme de l'action stimulante exercée par le TRH sur la synthèse de prolactine par des cellules GH3 a conduit à la mise en évidence d'un effet du TRH sur la synthèse des ARNm spécifiques de la prolactine, suggérant un rôle du TRH au niveau transcriptionnel ou à un stade précoce de la maturation des pré-messagers (A. MORIN).

Les recherches entreprises depuis quelques années, en vue d'analyser, en milieu chimiquement défini, les mécanismes impliqués dans le contrôle de la sécrétion de prolactine, ont conduit à deux types de résultats originaux. Elles montrent qu'en absence de sérum, l'effet stimulant du TRH sur la sécrétion de prolactine est amplifié, l'ED50 est diminuée d'un ordre de grandeur, alors que l'affinité n'est pas modifiée et que le nombre des sites de liaison est diminué d'un facteur 2. En outre, dans ces conditions, le TRH stimule la prolifération cellulaire, alors qu'il la réduit de près de 50 % en présence de

sérum. Par ailleurs, le transfert des cellules GH3 sur un milieu dépourvu de sérum a révélé la nécessité d'introduire un facteur d'attachement et d'étalement. Ce problème a été résolu par deux approches : l'introduction d'une glycoprotéine sérique, la P fétuine, ou l'ensemencement sur des matrices extracellulaires produites par les cellules endothéliales de cornée. En outre, on constate que ces deux types de substrat affectent de manière différente, non seulement la sécrétion basale de prolactine, mais également l'amplitude de la réponse au TRH et à l'œstradiol 17 β (N. BRUNET DE CARVALHO).

II. DIFFÉRENCIATION DES CELLULES HYPOTHALAMIQUES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT FŒTAL DE LA SOURIS

Dans le cadre de ses recherches sur la localisation d'antigènes spécifiques au cours du développement fœtal de l'hypothalamus de la souris, F. de VITRY a mis en évidence l'apparition, vers la naissance, de « GFA » (Glial Fibrillary Acid Protein), dans les tanicytes, épendymocytes spécialisés du recessus infundibulaire. La GFA étant un marqueur des astrocytes, on en conclut que les tanicytes, considérés jusqu'ici comme des cellules épendymaires primitives, appartiennent en fait à la lignée astrocytaire.

L'ontogénèse des enzymes de synthèse de neurotransmetteurs — choline acetyltransférase (ChAT), tyrosine hydroxylase (TH) et glutamic acid decarboxylase (GAD) — a été établie dans l'hypothalamus et les hémisphères cérébraux de la souris. L'évolution de l'activité de ces enzymes au cours du développement fœtal et post-natal a été confrontée à la capacité de liaison de la toxine tétanique par des préparations membranaires des mêmes régions. Alors que l'activité GAD apparaît essentiellement après la naissance, les activités de la ChAT et de la TH sont détectables très précocement (12-13 j fœtal), à peu près simultanément avec la capacité de lier la toxine tétanique. Ensuite, chacune de ces deux dernières activités enzymatiques évolue selon un rythme différent (J. PUYMIRAT).

La caractérisation morphologique et biochimique des neurones hypothalamiques fœtaux, cultivés dans un milieu synthétique précédemment établi, s'est poursuivie. L'étude quantitative montre que le nombre de neurones (cellules positives pour la toxine tétanique) reste sensiblement constant en culture. Parmi ceux-ci, 30 % sont reconnus par un anticorps anti-TRH et cette proportion varie peu en culture. Par contre, le contenu en TRH augmente en culture, indiquant qu'il y a développement d'un nombre fini de neurones. De plus, la formation de synapses a été mise en évidence au microscope électronique. L'addition de triiodothyronine (10^{-11} , 10^{-12} M) n'affecte pas le nombre de neurones, mais stimule très nettement l'extension neuritique. A la dose de

10⁻¹¹M, elle réduit l'activité de la ChAT sans affecter celle de la TH (PUYMIRAT et coll.). L'exploitation des potentialités de ce modèle *in vitro* pour l'analyse du développement neuronal se poursuit.

PUBLICATIONS

F. DE VITRY, R. PICART, C. JACQUE and A. TIXIER-VIDAL, *Glial fibrillary acidic protein. A cellular marker of tanicytes in the mouse hypothalamus (Developmental Neurosciences, 4, 457-460, 1981).*

N. BRUNET, A. RIZZINO, D. GOURDJI and A. TIXIER-VIDAL, *Effects of thyroliberin on cell proliferation and prolactin secretion by GH3/B6 rat pituitary cells : a comparison between serum-free and serum supplemented media (J. Cell Physiol., 109, 363-372, 1981).*

A. MORIN, C. AUFRAY and A. TIXIER-DUVAL, *Effect of thyroliberin on the biosynthesis of poly(A)-mRNA species in GH3 cells. Direct evidences for alterations in their distribution profiles and increased synthesis of the preprolactin mRNA (FEBS Letters, 131, 122-126, 1981).*

A. TIXIER-VIDAL and D. GOURDJI, *Mechanism of action of synthetic hypothalamic peptides on anterior pituitary cells (Physiol. Rev., 61, 974-1011, 1981).*

J.N. LAVERRIÈRE, D. GOURDJI, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL, *Thyroliberin is rapidly transferred to the nucleus of GH3 pituitary cells at both 4° and 37° (C. Biochem. Biophys. Res. Commun., 103, 833-840, 1981).*

A. TIXIER-VIDAL, M.F. MOREAU, R. PICART and D. GOURDJI, *Effect of chloroquine on thyroliberin interaction with clonal rat prolactin cells. Cytochemical correlates (Neuroendocrinology, 34, 180-190, 1982).*

D. GOURDJI, C. TOUGARD and A. TIXIER-VIDAL, *Clonal prolactin strains as a tool in Neuroendocrinology (Frontiers in Neuroendocrinology, vol. 7, edited by W.F. GANONG and L. MARTINI, Raven Press, New York, 1982, 317-357).*

C. TOUGARD, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL, *Immunocytochemical localization of prolactin in the endoplasmic reticulum of GH3 cells. Variations in response to thyroliberin (Biology of the Cell, 43, 89-102, 1982).*

N. BRUNET, D. GOURDJI and A. TIXIER-VIDAL, *Role of attachment and spreading factors : effect of fetuin on proliferation and prolactin secretion by GH3 cells and primary cultures of normal rat pituitary cells (Cold Spring*

Harbor Conferences on Cell Proliferation, Growth of Cells in Hormonally Defined Media, vol. 9, chap. 17, 169-177, 1982).

J. PUYMIRAT, C. LOUDES, A. FAIVRE-BAUMAN, J.M. BOURRE and A. TIXIER-VIDAL, *Expression of neuronal functions by mouse fetal hypothalamic cells cultured in hormonally defined media (Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation, vol 9, « Growth of Cells in Hormonally Defined Media », edited by D. SIRBASKU and G. SATO, chap. 90, 1033-1051, 1982).*

C. TOUGARD, A. MORIN, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL, *Rôle du reticulum endoplasmique dans la sécrétion de prolactine (Annales d'Endocrinologie, 42, 342-348, 1981).*

A. GIRARD, P. CRISANTI-COMBES, A. FAIVRE-BAUMAN, M.P. DUBOIS and P. PESSAC, *Mise en évidence de neuropeptides dans des cultures de cellules neurorétiniennes d'embryon de poulet (C.R. Acad. Sci., Paris, 293, 291-295, 1981).*

J. URIEL, A. FAIVRE-BAUMAN, J. TROJAN and D. FOIRET, *Immunocytochemical demonstration of alpha-fetoprotein uptake by primary cultures of fetal hemisphere cells from mouse brain (Neurosci. Lett., 27, 171-175, 1981).*

J.M. ISRAEL, B. DUFY, D. GOURDJI and J.D. VINCENT, *Effect of GABA on electrical properties of cultured rat pituitary tumor cells : an intracellular recording study (Life Sci., 29, 351-359, 1981).*

A. TIXIER-VIDAL, C. TOUGARD, B. DUFY and J.D. VINCENT, *Morphological, functional and electrical correlates in anterior pituitary cells (In : « Neuroendocrine Perspectives », vol. 1, edited by E.E. MULLER and R.M. Mac LEOD, Elsevier Biomedical Press, 211-251, 1982).*

A. TIXIER-VIDAL, J.N. LAVERRIÈRE, A. MORIN, C. TOUGARD and D. GOURDJI, *A cell biology approach to the mode of action of neuropeptides. The GH3 cell model (In : « Hormones and Cell Regulation », vol. 6, edited by J.E. DUMONT, J. NUNEZ and G. SCHULTZ, Elsevier Biomedical Press, 235-247, 1982).*

J. PUYMIRAT, A. FAIVRE-BAUMAN, B. BIZZINI and A. TIXIER-VIDAL, *Pre- and post-natal ontogenesis of neurotransmitter synthesizing enzymes and ¹²⁵I-tetanus toxin binding capacity in the mouse hypothalamus (Developm. Brain Res., 3, 199-206, 1982).*

MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS

M^{me} TIXIER-VIDAL et/ou ses collaborateurs ont participé aux réunions suivantes :

- 9th Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation (1-6 septembre 1981) ;
 - 8th Meeting of International Society of Neurochemistry (Nottingham, 11-13 septembre 1981) ;
 - Molecular and Cellular Interactions underlying Higher Brain Functions (septembre 1981, Abbaye de Fontevraud) ;
 - Table Ronde sur « Mécanismes Cellulaires de la Sécrétion des Hormones Protéiques (2^e Congrès Français d'Endocrinologie, Paris, septembre 1981) ;
 - 6^e Réunion Européenne « Hormones and Cell Regulation » (octobre 1981, Le Bischenberg) ;
 - Third International Meeting on Human Prolactin (26-28 octobre 1981, Athènes) ;
 - 2nd European Brain Winter Conference (Chamonix, 1982).
 - Symposium on « Drugs and Hormones on Brain Development » (7-8 avril 1982, Zurich) ;
 - Réunion Annuelle du Réseau Peptide de Chamerolles (mai 1982).
- Participation à l'enseignement universitaire :
- A.E.A. de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (D. GOURDJI) ;
 - D.E.A. de Physiologie de la Reproduction (A. TIXIER-VIDAL) ;
 - D.E.A. de Biologie Cellulaire (Orsay) (C. TOUGARD) ;
 - Cours de Cytochimie Ultrastructurale, Université des Cordeliers (C. TOUGARD).

Des séminaires ont été donnés dans divers laboratoires de la région parisienne, au Collège de France et en province (Bordeaux, Nice, Rennes, Strasbourg), ainsi qu'aux Etats-Unis (Medical School de Dartmouth, de Rochester) et au Canada (Université Laval, Québec).