

## Physiologie cellulaire

M. François MOREL, professeur

Sous le titre « mécanisme d'action des minéralocorticoïdes sur les cellules épithéliales », le cours de physiologie cellulaire a abordé un problème important et encore imparfaitement connu de la régulation du fonctionnement de certaines cellules épithéliales par une hormone de nature stéroïde, l'aldostérone.

Un rappel historique a permis de montrer pourquoi certaines questions essentielles, posées depuis bientôt 50 ans, sont restées sans réponse jusqu'ici, alors que des progrès remarquables ont été réalisés sur d'autres points.

On sait que l'ablation des surrénales chez l'animal ou la destruction de ces glandes chez l'homme, entraînent l'apparition d'un syndrome grave, comportant des troubles de l'équilibre électrolytique caractérisés par de l'hyponatrémie, de l'hypochlorémie, de l'hyperkaliémie, une tendance à l'acidose extracellulaire et une diminution du volume extracellulaire avec hypotension. En l'absence de correction adéquate, ce syndrome aboutit à la mort, on le sait depuis fort longtemps. Dès 1933, R.F. Loeb d'une part, et G.A. Harrop d'autre part devaient montrer que ces désordres électrolytiques résultent d'un trouble primitif du rein : en l'absence des hormones surrénaliennes, le rein n'est plus capable de réabsorber normalement le sodium ni d'excréter le potassium. Mais une importante question se posa bientôt, qui n'est pas complètement résolue aujourd'hui encore : les hormones corticosurrénaliennes exercent-elles une action plus ou moins généralisée à l'ensemble des tissus pour assurer la régulation de la distribution de l'eau et des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  entre milieux intra et extracellulaires, comme le préconisa Swingle à partir de 1934, ou bien, au contraire, ces hormones n'agissent-elles que sur le rein comme le défendirent Darrow et Harrison en 1938, les troubles de l'excrétion hydrominérale étant à leur tour responsables du tableau clinique général. Il faut rappeler que les hormones corticostéroïdes physiologiquement produites n'étaient pas encore connues à l'époque. Lorsque différents corticostéroïdes furent progressivement isolés, purifiés et essayés sur l'animal, il apparut que leurs effets biologiques relatifs variaient d'un

composé à l'autre ; certains stéroïdes comme la cortisone agissaient surtout sur le métabolisme glucidique, tandis que d'autres, comme la desoxycorticostérone étaient surtout efficaces à corriger les désordres du métabolisme ionique. Ceci conduisit Selye en 1946 à proposer de classifier les hormones de la corticosurrénale en plusieurs catégories en fonction de leurs effets physiologiques principaux, catégories pour lesquelles il proposa les noms de « minéralo-corticoïdes », « gluco-corticoïdes », « lipo-corticoïdes », etc. Bien qu'elle soit encore largement utilisée de nos jours, cette classification comporte des ambiguïtés — qui ont été longuement discutées au cours — et méritait d'être revue. Ni les effets biologiques produits, ni l'affinité de liaison avec les « récepteurs » moléculaires du cytosol ne présentent pour les corticostéroïdes naturels cette spécificité stricte qui puisse justifier l'usage de telles catégories. En fait, les différences observées sont plus de degré que de nature.

Il faudra attendre 1954 pour que les travaux des LUETSCHER, puis surtout ceux de Tait et Simpson aboutissent à l'isolement, la cristallisation, enfin l'analyse et la synthèse du « minéralo-corticoïde » physiologiquement sécrété dans le sang, l'aldostérone.

\*  
\*\*

Les actions physiologiques de l'aldostérone ont été rappelées, ainsi que son efficacité relative sur de nombreux tests biologiques par rapport à celle des autres hormones corticostéroïdes. Si l'aldostérone est bien, à doses égales, le plus puissant « minéralo-corticoïde » parmi tous les stéroïdes hormonaux naturels connus, elle n'en est pas pour autant dépourvue d'action gluco-corticoïde. Mais elle est sécrétée par le cortex surrénal en quantité beaucoup plus faible que le cortisol ou la corticostérone par exemple.

Enfin, une courte discussion a également porté sur les différences qui existent entre gluco-corticoïdes et minéralocorticoïdes (aldostérone) en ce qui concerne leurs cellules d'origine dans le cortex surrénal et les modalités de la régulation de leur sécrétion. On sait en effet que la corticostérone (et le cortisol) sont produits par la zone fasciculée sous un contrôle exercé par l'ACTH. L'aldostérone au contraire provient de la zone glomérulée et sa sécrétion est contrôlée par la teneur en électrolytes du plasma (rapport Na/K) et par l'angiotensine circulante. Mentionnons que dès 1956, c'est-à-dire longtemps avant la découverte du système rénine-angiotensine, Bartter avait déjà montré chez l'homme que lorsqu'on applique simultanément deux stimuli (produisant séparément un effet inverse), à savoir une expansion volumique associée à une hyponatrémie ou, réciproquement, une baisse du volume plasmatique associée à une hypernatrémie, la surrénale répond en priorité au stimulus volémique et non au stimulus osmotique. Or l'hypovolé-

mie entraîne, on le sait aujourd'hui, une libération importante de rénine par le système juxtaglomérulaire.

\*  
\*\*

Deux méthodes peuvent être utilisées pour rechercher quelles sont les cellules-cibles de l'action des minéralocorticoïdes. L'une consiste à mettre en évidence les effets que l'aldostérone produit sur elles. L'autre consiste à rechercher la présence de récepteurs cytosoliques liant spécifiquement l'aldostérone marquée.

C'est bien évidemment la première de ces méthodes qui a permis de reconnaître très tôt l'action exercée par les hormones surrénaliennes sur l'excrétion des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  par le rein. C'est elle également qui a permis, plus tard, de montrer qu'en plus du rein, l'aldostérone doit agir aussi sur diverses glandes (glandes sudoripares et salivaires, par exemple, ou leurs canaux excréteurs), puisque l'hormone abaisse sélectivement le rapport  $\text{Na}/\text{K}$  dans leur produit de sécrétion. On sait, enfin, que l'aldostérone est encore capable de stimuler le transport actif de sodium dans les structures épithéliales des amphibiens impliqués dans l'osmorégulation, notamment l'épithélium de la peau et de la vessie. Cet effet de l'aldostérone peut être induit *in vitro* en ajoutant l'hormone dans le milieu de survie. La réponse apparaît après une latence d'une à deux heures.

L'utilisation d'aldostérone tritiée a permis de montrer, dans les tissus qui répondent à l'aldostérone, la présence dans le cytosol de sites liant l'hormone marquée avec une affinité élevée. La liaison est déplacée plus efficacement par les minéralocorticoïdes que par les glucocorticoïdes. Comme pour les récepteurs d'autres hormones stéroïdes, la liaison de l'aldostérone entraîne l'activation du récepteur cytosolique et le transfert du complexe dans le noyau. Toujours comme pour d'autres hormones stéroïdes, les effets hormonaux sur le transport des électrolytes ne se produisent plus en présence d'inhibiteurs de la transcription ou de la traduction.

\*  
\*\*

Le mécanisme moléculaire par lequel le complexe hormone-récepteur associé à la chromatine contrôle (par induction ou dérégulation) l'expression de certaines protéines génomiques n'est pas connu actuellement, ni d'ailleurs le nombre et la nature des gènes dont la transcription est modifiée par l'hormone. On sait cependant que la synthèse de certaines protéines est stimulée par l'hormone, tandis que celle d'autres protéines est inhibée. Dans le cas de l'aldostérone, il est aujourd'hui établi — au moins pour certaines cellules-

cibles du rein des mammifères ou de la vessie des amphibiens — que trois niveaux critiques dans le système de transport du sodium sont affectés par l'aldostérone.

1) L'entrée des ions  $\text{Na}^+$  à travers la face apicale des cellules épithéliales; cette entrée est le facteur limitant du transport et sa sélectivité ionique est assurée par une perméase membranaire. Le flux net entrant de sodium est passivement commandé par la différence de potentiel électrochimique favorable existant pour les ions sodium. La perméase n'a pas été caractérisée chimiquement; on sait cependant que cette protéine interagit avec l'amiloride, inhibiteur spécifique du transport apical de sodium. L'aldostérone contrôlerait le nombre des unités de perméase présentes dans la membrane.

2) La  $[\text{Na-K}]$  ATPase responsable de l'étape « active » du transport de sodium est également contrôlée par l'aldostérone. L'enzyme couple, dans les membranes cellulaires basolatérales, la sortie de sodium et l'entrée de potassium (contre leurs gradients électrochimiques respectifs) à l'hydrolyse d'ATP. Le système de transport est inhibé par l'ouabaine, qui se lie spécifiquement à la  $[\text{Na-K}]$  ATPase. Après surrénalectomie, l'activité  $[\text{Na-K}]$  ATPasique diminue de 50 à 75 pour cent dans les cellules de certains segments distaux ou terminaux du rein des mammifères. L'injection *in vivo* de faibles doses d'aldostérone la rétablit à sa valeur normale en moins de trois heures. L'hormone augmente le  $V_{\text{max}}$  de l'enzyme sans affecter son  $K_m$  pour l'ATP, le  $\text{Na}^+$  ou le  $\text{K}^+$ .

3) Enfin, dans les mêmes cellules tubulaires du rein des mammifères, il a été également observé que la surrénalectomie diminue et l'injection d'aldostérone restaure avec une relative spécificité l'activité d'une enzyme mitochondriale, la citrate synthétase.

On voit donc que l'aldostérone contrôle l'activité de trois systèmes au moins qui sont impliqués à des titres divers dans le transport transépithélial du sodium. Les trois étapes correspondantes à savoir l'entrée sélective du sodium dans la cellule par une de ses faces, son extrusion par transport actif par l'autre de ses faces, et la synthèse d'ATP, pourraient évidemment toutes les trois agir comme facteur limitant l'intensité du transport d'ions. En fait, trois théories du mécanisme d'action de l'hormone ont été défendues, chacune préconisant que l'un des effets décrits ci-dessus représente l'effet primaire vrai de l'hormone, les deux autres réponses correspondant à des adaptations secondaires et indirectes. Ainsi, pour les tenants de la théorie de la « perméase », c'est l'entrée accrue de sodium dans les cellules (sous l'effet primaire de l'hormone) qui induirait à son tour une activation de la  $[\text{Na-K}]$ ATPase, puis celle-ci un ajustement de la synthèse d'ATP.

Faute de preuves expérimentales permettant à ce jour de trancher entre ces différentes théories, il semble plus raisonnable de ne pas s'enfermer dans cette manière de poser le problème. Il est en effet tout aussi légitime de poser que l'aldostérone pourrait avoir, sur le génome, une action pleiotrope. En d'autres termes, l'action régulatrice de l'aldostérone pourrait comporter le contrôle primaire, au niveau nucléaire, de la transcription et de la synthèse de plusieurs protéines à la fois, à savoir toutes celles qui sont susceptibles de devenir, à des titres divers, des facteurs limitants de la réponse biologique. Ainsi pourrait se réaliser de façon coordonnée et efficace la stimulation d'une fonction aussi complexe que le transport transépithélial des ions sodium et potassium.

\*

\*\*

Si le mécanisme moléculaire par lequel les hormones stéroïdes contrôlent l'expression du génome dans leurs cellules-cibles chez les eucaryotes n'est pas encore connu, il n'en va pas de même dans le cas de l'induction métabolique chez les bactéries ou encore du mécanisme d'action du répresseur du phage  $\lambda$  chez *E. Coli*. Les progrès spectaculaires réalisés sur ces systèmes ont été rappelés, de même que les travaux qui ont conduit à l'étude de la structure moléculaire tout à la fois du répresseur et des régions du DNA (opérateur) sur lesquelles il se fixe spécifiquement. Bien que les modalités de détail varient dans chaque cas, des règles d'une certaine généralité émergent. Les répresseurs sont des agents protéiniques bifonctionnels, en général des dimères, capables d'une part de lier spécifiquement un agent inducteur (ligand exogène ou endogène) et d'autre part de reconnaître spécifiquement une séquence de bases de l'opérateur. La liaison du ligand, par le changement de conformation qui en résulte, permet (induction) ou empêche (dérépression) l'interaction du répresseur avec le DNA. L'étude de la séquence des aminoacides et de la conformation de la région du dérépresseur qui se lie avec le DNA a été réalisée dans plusieurs cas, ainsi que celle de la séquence des bases correspondantes dans le DNA. L'interaction intéresse 12 à 18 paires de bases du DNA opérateur et comporte des liaisons non covalentes de faible énergie en plusieurs points, avec le squelette phosphate-sucre et surtout avec des bases du DNA dans le sillon majeur. La liaison du répresseur avec le DNA se trouve fortement stabilisée par sa structure dimérique et par l'organisation remarquable des bases du DNA opérateur qui comporte, par rapport à son point milieu, une symétrie accusée dans la séquence des bases (lue dans le sens 3'-5') de chacune des deux chaînes du DNA. Une telle symétrie permet la liaison indépendante des sites de reconnaissance homologues de chacun des monomères constituant le répresseur. Lorsqu'il est lié au DNA de l'opérateur, le répresseur inhibe la transcription des gènes de cet opéron par empêchement stérique

de la liaison de la RNA polymérase sur son site promoteur correspondant. En effet, sites opérateur et promoteur se recouvrent partiellement.

La conformation spatiale des régions se liant au DNA comporte, chez les divers répresseurs étudiés jusqu'ici, des analogies frappantes. Des régions en  $\alpha$  hélice de structure moléculaire partiellement commune leur permet d'entrer en contact avec les bases du DNA dans le sillon majeur.

Dans cette régulation de l'expression génétique exercée par certains signaux chimiques chez les bactéries (induction, répression), la double spécificité de reconnaissance requise (spécificité du signal régulateur et spécificité de la structure du DNA de l'opérateur correspondant) est assurée principalement par les propriétés des répresseurs. Il faut noter cependant que l'efficacité de la reconnaissance des sites opérateurs est grandement améliorée par la symétrie qui semble caractériser la séquence des bases le long des deux brins du DNA opérateur.

On ignore si la régulation exercée par les hormones stéroïdes sur le DNA des mammifères répond à des mécanismes analogues à ceux qui sont connus chez les prokaryotes. Les travaux faits récemment sur l'action tumorigène des glucocorticoïdes sur une lignée de cellules mammaires transformées de souris (MMTV) ne sont pas incompatibles avec une telle possibilité. Il reste cependant à établir dans le cas des hormones stéroïdes si les récepteurs cytosoliques activés sont capables, après translocation nucléaire, d'interagir directement et spécifiquement avec certaines régions privilégiées du DNA comme le font les répresseurs sur leurs sites opérateurs.

\*  
\*\*

Enfin, le mécanisme d'action des minéralocorticoïdes chez les mammifères soulève un problème de nature physiologique qui a suscité un grand nombre de recherches sans qu'une réponse satisfaisante y ait été encore apportée. Il s'agit du phénomène dit « d'échappement ». Lorsqu'on administre de façon prolongée des doses élevées d'aldostérone (ou plus généralement d'un minéralocorticoïde) chez l'homme ou l'animal, on observe l'effet attendu de rétention sodique et d'excrétion potassique pendant les premiers jours seulement, puis, malgré la poursuite du traitement, l'excrétion urinaire du sodium augmente progressivement et revient à la normale. On dit que le rein a « échappé » à l'action de l'aldostérone. En fait, l'effet de l'hormone sur les cellules-cibles spécifiques se maintient durablement, comme l'attestent un rapport Na/K abaissé dans la sueur ou la salive, ainsi qu'une activité de la [Na-K]ATPase augmentée sélectivement dans les tubules collecteurs du rein. L'échappement correspond à une adaptation secondaire du rein à la rétention sodique et à l'expansion extracellulaire qui se produisent au

début du traitement par l'hormone. L'échappement implique donc que, dans les reins, certains segments tubulaires réabsorbent davantage de sodium (en réponse à l'hormone injectée), alors que la réabsorption est inhibée dans d'autres segments tubulaires ; ces deux effets inverses se compensent quantitativement, et la balance externe du sodium est rétablie malgré l'administration de minéralocorticoïdes. L'échappement est d'autant plus précoce que le régime est plus riche en sodium. Les expériences de microponction destinées à rechercher dans le rein où sont localisés les segments responsables du phénomène d'échappement n'ont pas abouti à des résultats univoques. Ni une augmentation de la filtration glomérulaire, ni une inhibition de réabsorption proximale ne semblent représenter les facteurs principaux en cause. Une réduction du transport actif dans l'anse de Henle (segment de dilution) et surtout dans le tubule contourné distal constitue l'hypothèse aujourd'hui la plus plausible ; mais elle reste à démontrer expérimentalement. Le mécanisme — humoral ou nerveux — par lequel l'expansion extracellulaire induite par l'hormone déclenche à son tour le phénomène d'échappement dans le rein n'a pas non plus été reconnu à ce jour, malgré le grand nombre de recherches que son étude a suscité. Le rôle relatif d'un certain nombre de facteurs susceptibles de faire varier l'excrétion du sodium par le rein a été discuté.

\*  
\*\*

Enfin nous avons abordé le rôle des minéralocorticoïdes dans le mécanisme de concentration de l'urine par le rein. On sait que chez l'animal surrénalectomisé le pouvoir de concentration comme le pouvoir de dilution de l'urine par le rein sont fortement diminués. On sait aussi que le travail osmotique du rein est la conséquence d'un mécanisme d'échange par contre-courant dans les régions médullaires de l'organe. Le gradient corticopapillaire de pression osmotique qui est présent dans ces régions résulte d'un transport actif de sel dans les branches larges ascendantes des anses de Henle. En l'absence de minéralocorticoïdes, ce gradient de pression osmotique est atténué, voire aboli, bien que l'échange passif par contre-courant ait gardé son efficacité. On en déduit que c'est la composante active du processus de concentration — la réabsorption de sel dans le segment de dilution — qui se trouve sous le contrôle de l'hormone. Mais les arguments disponibles en faveur d'une action primaire et directe de l'aldostérone sur ce segment du néphron font encore défaut, et la [Na-K]ATPase que contient ce segment n'est pas restaurée par l'aldostérone chez l'animal surrénalectomisé comme l'est celle contenue dans le tubule collecteur.

On constate, en conclusion, que bien des aspects du ou des mécanismes par lesquels les minéralocorticoïdes maintiennent l'équilibre électrolytique chez les mammifères et contrôlent le fonctionnement de leurs reins restent

encore élucider. Il ne faut pas s'en étonner outre mesure, puisque aussi bien les facteurs qui contribuent, chacun pour sa part, à assurer l'excrétion hydrominérale sont nombreux et diversifiés et exercent leur action sur un effecteur principal, le rein, dont le fonctionnement intégré est singulièrement complexe.

F. M.

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

Programme des séminaires :

14 janvier : M<sup>me</sup> E. OBLIN : Caractéristiques de l'interaction entre l'aldostérone et ses récepteurs.

21 janvier : M. A. DOUCET : Induction de la [Na-K]ATPase rénale par les corticoïdes.

28 janvier : M. P. ROBEL : Etapes nucléaires du mécanisme d'action des hormones stéroïdes.

18 février : M<sup>ll</sup> N. FARMAN : Corticostéroïdes : Localisation, translocation et métabolisme le long du néphron.

25 février : M. G. ROUSSEAU : Effet des glucocorticoïdes sur la membrane pericellulaire.

4 mars : M. A. VANDEWALLE : Modulation par la DOCA de l'incorporation d'uridine le long du néphron.

11 mars : M. B. ROSSIER : Contrôle hormonal de la synthèse et de l'expression de la [Na-K]ATPase.

18 mars : M. R. OZON : Un exemple d'action posttranscriptionnelle d'une hormone stéroïde : l'action de la progestérone sur l'ovocyte d'Amphibien.

#### TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Comme nous l'avons signalé dans notre rapport d'activité de l'année dernière, deux équipes de recherche du laboratoire ont essaimé au cours de l'année 1982 et se sont implantées dans le Centre de Pharmacologie-Endocrinologie récemment créé à Montpellier. Ces équipes étaient celles d'« Endocrinologie moléculaire » dirigée par S. Jard et celle des « Récepteurs des



neuromédiateurs » dirigée par J. Bockaert. Elles ne figurent donc plus dans le présent rapport d'activité, sauf en ce qui concerne leurs publications parues (depuis notre précédent rapport) au titre du laboratoire de Physiologie cellulaire.

L'année 1982-1983, par contre, a vu se constituer dans le laboratoire une petite équipe de « Biophysique des Membranes » sous la direction de Cl. Gary-Bobo. L'objectif scientifique, poursuivi en collaboration avec J.-M. Lehn et son équipe, consiste à étudier le comportement physico-chimique et les propriétés de transport des « cryptates », synthétisés par J.-M. Lehn et collaborateurs, sur des systèmes modèles des membranes biologiques, les liposomes et les « black » membranes. De telles études représentent une étape indispensable avant que l'utilisation de tel ou tel cryptate puisse être envisagée sur un système biologique complet. L'équipe en voie de constitution comporte aujourd'hui deux chercheurs et un agent technique.

## I. ÉQUIPE DE PHYSIOLOGIE RÉNALE

Cette équipe, à elle seule, représente l'activité principale du laboratoire aussi bien par le nombre de ses chercheurs et techniciens que par sa production scientifique. Depuis notre rapport de l'année dernière, deux chercheurs permanents et deux agents techniques sont venus la grossir. Nous n'avons pas jugé utile jusqu'ici de scinder cette équipe en groupes nettement individualisés, car son activité scientifique est unitaire. Les huit subdivisions qui suivent correspondent donc moins à des thématiques de recherche qu'aux microméthodes expérimentales différentes qui sont mises en œuvre sur des segments uniques de tubules rénaux pour analyser des aspects variés et complémentaires de leurs propriétés physiologiques. Dans leur majorité, les recherches effectuées durant l'année écoulée prolongent celles engagées dans les années précédentes. Deux rubriques seulement correspondent à des approches nouvelles.

### 1) *Adénylate-cyclase hormone dépendente de segments isolés des néphrons* (M. IMBERT-TEBOUL, D. CHABARDES, M. MONTEGUT)

Nous avons fait le bilan complet, dans notre précédent rapport, des résultats obtenus depuis bientôt huit ans grâce à cette microméthode mise au point au laboratoire ; nous n'y reviendrons donc pas cette année ; signalons cependant que divers programmes de recherche mentionnés plus loin ont comporté la mesure de l'activité adénylate-cyclasique sur segments isolés du néphron et l'étude de sa stimulation par des agonistes hormonaux.

2) *Régulation de la production endogène de cAMP par des segments tubulaires en survie in vitro* (D. CHABARDES, M. IMBERT-TEBOUL, M. MONTEGUT)

Les études d'inhibition par des agonistes  $\alpha_2$  de l'accumulation d'AMP cyclique induite par la vasopressine sur la partie médullaire du canal collecteur (cf. rapport 1982) ont été étendues à la partie corticale de ce segment. Les agonistes  $\alpha_2$  inhibent d'environ 80 % l'action de l'hormone antidiurétique. Cet effet inhibiteur est spécifique vis-à-vis de la vasopressine, les réponses à l'isoprotérénol, agoniste  $\beta$  adrénergique, au glucagon et à la calcitonine n'étant pas modifiées. Or, des expériences d'additivité de l'activité adényl cyclasique nous avaient montré, au moins en ce qui concerne la vasopressine et la calcitonine, que ces deux hormones agissent sur le même type de cellule, les cellules principales du canal collecteur. L'action inhibitrice des agonistes  $\alpha_2$  qui est observée seulement sur l'accumulation d'AMP cyclique induite par la vasopressine implique que le mécanisme de l'inhibition ne s'exerce pas directement sur l'adénylate cyclase elle-même mais plutôt sur l'efficacité du couplage à l'enzyme de certains des récepteurs hormonaux présents dans une même cellule.

3) *Etude des récepteurs du rein aux hormones*

A) *Récepteurs de la vasopressine* (D. BUTLEN et G. GUILLON)

a) Les récepteurs rénaux de la vasopressine ont été antérieurement solubilisés et partiellement purifiés sous deux formes moléculaires principales : une forme légère de faible affinité pour la vasopressine et une forme lourde de haute affinité pour l'hormone : cette dernière forme étant la seule sensible à l'action des guanyl nucléotides.

Sur la base de ces données expérimentales antérieures du laboratoire, nous avons étudié les variations des paramètres cinétiques caractéristiques de la liaison de lysine-vasopressine tritiée sur les membranes rénales de rat en fonction du temps d'incubation à 30 °C. La constante de dissociation diminuait progressivement en fonction du temps (les valeurs mesurées après 10 et 60 minutes étaient respectivement égales à  $4,3 \pm 0,6$  et à  $1,2 \pm 0,2$  nM) alors que la capacité maximale de fixation hormonale spécifique restait constante ( $0,58 \pm 0,07$  pmoles de vasopressine tritiée liée/mg de protéine). Dans chaque condition expérimentale, l'équilibre de la liaison était atteint comme l'atteste la linéarisation des courbes dose-fixation dans le système de coordonnées de Scatchard. Le récepteur rénal de la vasopressine existerait donc sous deux formes interconvertibles d'affinités différentes.

Cette transition d'affinité du récepteur rénal ne s'effectuait qu'en présence d'ions  $Mg^{2+}$  et la concentration de  $Mg^{2+}$  induisant la demi-transition maximale était de l'ordre de 3  $\mu M$ .

Ce phénomène a été reproduit avec l'arginine-vasopressine et des analogues structuraux de la vasopressine possédant une activité antidiurétique *in vivo*, mais non avec les antagonistes de l'action antidiurétique de la vasopressine, ce qui suggère que cette transition d'affinité du récepteur est spécifique des agonistes antidiurétiques.

L'action des guanyl nucléotides sur la liaison hormonale était aussi fonction du temps d'incubation des membranes rénales : aucun effet n'a été détectable après 10 minutes d'incubation, alors qu'après 60 minutes la valeur de la constante de dissociation mesurée en présence de guanyl nucléotides ( $4,1 \pm 1,0$  nM) a été statistiquement différente de celle mesurée en leur absence ( $1,2 \pm 0,2$  nM), ce qui indique que seule la forme de haute affinité du récepteur est sensible à ces agents. De plus, le NaF diminue la vitesse de conversion de la forme à faible affinité en forme de haute affinité.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la forme de haute affinité du récepteur présent dans les membranes rénales pourrait correspondre à la forme lourde du récepteur solubilisé. Cette dernière serait probablement un complexe entre le récepteur de faible affinité et une sous-unité de la protéine de couplage liant les guanyl nucléotides. Le NaF impliquant la mobilisation de la protéine de couplage dans le mécanisme d'activation de l'adényl cyclase limiterait le nombre de ces protéines disponibles dans le processus d'interaction avec les complexes vasopressine-forme légère.

b) Les variations de sensibilité du rein et du foie à la vasopressine en fonction de la concentration d'hormone antidiurétique circulante ont été étudiées dans deux situations expérimentales : lors de traitements chroniques de rats de la souche Brattleboro (DI/DI) avec des doses physiologiques de (1-deamino, 8-D-arginine) — vasopressine (dDAVP; analogue à forte activité antidiurétique et à faibles activités vasopressique et glycolytique) et lors de traitements aigus de rats Wistar avec des doses pharmacologiques de vasopressine ou d'analogues.

Chez les rats DI/DI, le nombre de récepteurs rénaux de l'ADH et la réponse maximale de l'adényl-cyclase membranaire à la vasopressine sont inférieurs à ceux des rats de la souche Long Evans (+/+). Par contre, les nombres de récepteurs hépatiques et leur affinité pour l'hormone ne sont pas différents dans les deux groupes. Le traitement chronique des rats DI/DI à la dDAVP a ramené à la normale le nombre des récepteurs rénaux de l'ADH sans modifier les paramètres cinétiques de la liaison de vasopressine tritiée et d'angiotensine tritiée sur les membranes hépatiques.

L'infusion intraveineuse continue de doses pharmacologiques d'arginine-vasopressine durant deux heures à des rats Wistar engendre une disparition totale des récepteurs rénaux et une perte d'environ 50 % des récepteurs hépatiques de la vasopressine, sans altérer les nombres et constantes de dissociation des récepteurs hépatiques de l'angiotensine, des agents  $\alpha$ -adrénergiques et du glucagon. Ce phénomène de désensibilisation hormonale homologue est étroitement fonction des activités biologiques des peptides utilisés. D'une part, la dDAVP a induit une désensibilisation totale du système adényl cyclasique rénal vasopressine-dépendant alors qu'elle n'a pas modifié le nombre et la constante de dissociation des récepteurs hépatiques de l'ADH; d'autre part, les inhibiteurs compétitifs de la vasopressine n'ont aucun effet sur les deux types de récepteurs hormonaux. La désensibilisation serait donc la conséquence de la liaison d'un agoniste actif sur le récepteur hormonal. Dans la mesure où la vitesse d'inactivation des récepteurs occupés semble être beaucoup plus rapide que celle des récepteurs libres, la saturation de l'ensemble des récepteurs hormonaux *in vivo* par des doses pharmacologiques de vasopressine ou d'analogues actifs pourrait expliquer simplement la disparition des récepteurs qui a été observée dans ces conditions expérimentales.

c) Dans la ligne des études effectuées antérieurement sur les récepteurs rénaux et hépatiques de l'hormone antidiurétique, une nouvelle série d'analogues structuraux synthétiques de la vasopressine ont été testés sur des membranes rénales et hépatiques de rat. Les résultats obtenus ont confirmé les différences de reconnaissance pharmacologique des analogues existant entre les récepteurs hépatiques (de types  $V_1$ , non couplés à une adényl cyclase) et les récepteurs rénaux (de type  $V_2$ , couplés à une adényl cyclase) de la vasopressine. Ce travail a permis d'identifier un analogue possédant une activité antidiurétique *in vivo* chez le rat, la [1-(acide  $\beta$ , mercapto  $\beta$ ,  $\beta$ -cyclopentaméthylène propionique), 2-O-ethytyrosine 4-valine, 8-D-arginine]-vasopressine comme étant un excellent inhibiteur compétitif de l'activation de l'adényl-cyclase rénale induite par la vasopressine.

B) *Localisation des récepteurs du glucagon le long du néphron de rat*  
(D. BUTLEN et R. RAJERISON)

Les travaux effectués antérieurement sur des fragments microdisséqués de néphron de rat ont montré que le glucagon stimulait des activités adényl cyclasiques essentiellement dans la branche ascendante de l'anse de Henle et dans la partie médullaire du canal collecteur. Le travail actuel consiste à localiser les récepteurs spécifiques du glucagon en incubant des fragments microdisséqués de néphron de rat en présence de glucagon marqué à l'iode<sup>125</sup>. Dans la branche large ascendante, la capacité maximale de fixation spécifique du glucagon<sup>125</sup>I est de l'ordre de 20 attomoles/mm de longueur et la constante de dissociation de l'ordre de 0,5 nM.

On voit donc que la détection des sites récepteurs d'une hormone donnée sur des segments uniques de néphron par étude de la liaison de cette hormone marquée est possible, mais exige, pour obtenir une précision suffisante, que la radioactivité spécifique du ligand radioactif utilisé soit d'un ordre de grandeur que seul le marquage par  $^{125}\text{I}$  permet d'atteindre.

4) *Etude de la Na-K-ATPase de segments isolés des néphrons* (A. DOUCET et G. EL MERNISSI)

Les travaux poursuivis au cours de cette année sont dans le prolongement des activités des deux dernières années qui visaient à caractériser les relations existant *in vivo* entre les corticoïdes surrénaliens et l'activité de la pompe à sodium dans le rein des mammifères. Les principaux résultats acquis indiquent que :

a) Chez le lapin comme chez le rat, la surrénalectomie est accompagnée par une diminution de l'activité de la Na-K-ATPase tout le long du néphron (à l'exclusion cependant du tubule contourné proximal chez le lapin).

b) L'activité Na-K-ATPasique de tubules collecteurs de rats surrénalectomisés est augmenté après injection d'une dose physiologique unique d'aldostérone. Cette stimulation enzymatique présente des caractéristiques de cinétique et de dépendance vis-à-vis de la dose d'hormone identiques à celles observées pour l'effet antinatriurétique.

c) L'administration à des lapins surrénalectomisés de doses physiologiques d'aldostérone ou de dexaméthasone restaure en 3 heures l'activité de la Na-K-ATPase spécifiquement dans les segments cibles de ces hormones, à savoir, le tubule collecteur pour la première et l'anse large ascendante de Henle et le tubule contourné distal pour la seconde.

Ces résultats, dont la plupart sont en cours de publication, indiquent que la Na-K-ATPase, et, par conséquent, le transport de sodium, sont sous le contrôle des deux types de stéroïdes surrénaliens. Les termes de glucocorticoïde ou de minéralocorticoïde apparaissent donc erronés pour qualifier ces hormones et ne devraient plus être employés que pour décrire des effets physiologiques uniquement. D'autre part, la similarité des cinétiques d'induction par l'aldostérone de la réabsorption de sodium et de l'activité de la Na-K-ATPase permet de penser que l'effet enzymatique pourrait être le déterminant de l'action antinatriurétique de l'hormone, c'est-à-dire la cible primaire de ce stéroïde. L'étude expérimentale *in vitro* de ces phénomènes d'induction de la Na-K-ATPase dans des tubules collecteurs maintenus en survie est actuellement en développement afin d'en préciser les modalités.

Un certain nombre de collaborations ont été établies avec des laboratoires étrangers désireux d'appliquer à leurs modèles expérimentaux la technique du microdosage de l'activité Na-K-ATPase de segments isolés de néphron développée au laboratoire.

En collaboration avec J. Meckler et D. Ben-Ischay de l'Université Mount Scopus de Jérusalem, une étude a été effectuée chez une souche de rats spontanément hypertendus élevée par ces auteurs. La distribution de la Na-K-ATPase a été comparée le long des néphrons de rats normaux et hypertendus. La similarité des résultats chez les deux souches de rats exclut tout rôle de la pompe rénale dans l'étiologie de l'hypertension essentielle.

Une souche mutante de souris présentant des symptômes de rachitisme et une hypophosphatémie est étudiée depuis plusieurs années par M. Gagnan-Brunette de l'Hôpital Maisonneuve de l'Université de Montréal. Ce syndrome résulte d'une phosphaturie excessive due, au moins en partie, à un déficit de la réabsorption de phosphate par le tubule proximal. La réabsorption de phosphate étant dépendante de celle du sodium, nous avons recherché si le trouble était associé de quelque façon à une altération du système de transport du sodium. Aucune différence d'activité Na-K-ATPase n'a été observée au niveau du tubule proximal entre les animaux témoins et malades. Par contre, chez ces derniers, une nette stimulation de l'activité de la pompe a été détectée au niveau du tubule distal. Bien que son interprétation physiologique demeure inconnue, cette observation vient s'ajouter à celles des nombreuses altérations du fonctionnement rénal précédemment décrites chez cette souche mutante.

##### 5) *Etude du système kallikréine-kinine rénal* (J. MARCHETTI et M. IMBERT-TEBOUL)

Le rôle exact du système kallikréine-kinine rénal reste encore inconnu malgré les nombreuses expériences qui suggèrent une intervention de ce système dans le transport du sodium. Des mesures de l'activité kininogène effectuées le long du néphron microdisséqué de lapin ont montré que la kallikréine est essentiellement localisée dans le tubule connecteur : partie granuleuse des tubules distaux et des canaux collecteurs (cf. rapport 1981). L'étude de la kallikréine au niveau de ce tubule a été poursuivie. Deux types d'expériences ont été effectuées : 1) des expériences d'ordre biochimique en vue de mettre en évidence une forme inactive de l'enzyme ; 2) des expériences d'ordre physiologique dans le but d'étudier les rapports entre le système kallikréine-kinine rénal et les minéralocorticoïdes.

Une forme inactive de la kallikréine (activable par la trypsine) a été mise en évidence au niveau du tubule connecteur. A ce niveau, la kallikréine

inactive ou prékallikréine est environ trois fois plus abondante que la kallikréine active. Les deux formes de kallikréine sont aussi retrouvées dans les urines, cependant leurs rapports ne sont pas du tout comparables. La kallikréine active représente la majeure partie de la kallikréine urinaire — la fraction inactive n'étant que le tiers de l'enzyme actif. Les résultats indiquent que, dans le rein, la kallikréine est présente essentiellement sous la forme inactive et c'est surtout la forme active de l'enzyme qui est excrétée dans les urines.

Un traitement chronique à la DOCA augmente la kallikréine active du tubule connecteur, mais ne modifie pas la prékallikréine. La surrénalectomie entraîne une diminution de la kallikréine active et inactive, mais une injection aiguë d'aldostérone (10  $\mu$ g) ou de dexaméthasone (100  $\mu$ g) ne restaure pas les activités kallikréines des lapins surrénalectomisés, mesurées trois heures après l'injection. Le manque de réponse n'est pas dû aux faibles quantités de corticoïdes injectées, puisque chez ces lapins l'activité Na-K-ATPase des tubules collecteurs (diminuée après surrénalectomie) retourne à la normale après injection d'aldostérone. La synthèse et l'activation de la kallikréine sont donc soumises au contrôle des hormones corticosurréaliennes. Cependant l'influence des corticoïdes n'est pas directe puisque les injections d'aldostérone capables de restaurer chez l'animal surrénalectomisé l'activité ATPasique des tubules collecteurs sont sans effet sur les activités kallikréines des tubules connecteurs.

6) *Mesure in vitro du métabolisme oxydatif sur des fragments isolés de néphron — Couplage au transport de sodium* (A. HUS-CITHAREL, F. LE BOUFFANT et F. MOREL)

Comme nous l'avons précédemment indiqué, il est possible à l'aide d'une technique simple de mesurer *in vitro* la production de  $^{14}\text{CO}_2$  par des segments uniques de tubule à partir de substrats organiques uniformément marqués par le  $^{14}\text{C}$ . Le  $^{14}\text{CO}_2$  formé est recueilli dans de la potasse par périodes successives de 30 minutes pendant un temps variant de deux à trois heures. Après avoir étudié les propriétés métaboliques de la branche large ascendante de l'anse de Henle, nos travaux ont porté sur le fragment initial du tubule contourné distal (DCT) et les portions corticale et médullaire du canal collecteur de rat (CCT, MCT). Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

— le DCT utilise préférentiellement le lactate au glucose lorsque les deux substrats sont présents dans le milieu d'incubation (l'un des deux substrats étant marqué au  $^{14}\text{C}$ ).

A l'inverse, en ce qui concerne le tubule collecteur, le CCT oxyde de manière préférentielle le glucose.

— Par ailleurs, l'addition dans le milieu d'incubation soit d'ouabaine ( $10^{-3}\text{M}$ ), soit d'amiloride ( $10^{-5}\text{M}$ ) entraîne une inhibition de l'ordre de 50 à 60 % de la production de  $\text{CO}_2$  par le canal collecteur. Ces résultats indiquent que la lumière tubulaire du CCT et du MCT est accessible aux ions sodium et à l'amiloride et qu'une part importante de la production de  $\text{CO}_2$  obtenue à partir d'un substrat donné est directement couplée au transport actif transépithélial de sodium.

— Quand la pression osmotique de l'incubat est augmentée par addition de mannitol, une production de  $\text{CO}_2$  maximum est obtenue vers 380 mosm/l dans le cas du CCT et vers 600 mosm/l dans le cas du MCT.

Il apparaît donc que, sous certaines conditions, le métabolisme oxydatif du tubule collecteur est le reflet direct de l'activité  $[\text{Na}^+\text{-K}^+]\text{ATP}$ asique. Nous nous sommes intéressé à étudier la production de  $\text{CO}_2$  par des CCT de rat surrénalectomisé, puisqu'il a été montré par ailleurs dans le laboratoire (G. EL MERNISSI et A. DOUCET) qu'après surrénalectomie l'activité  $[\text{Na}^+\text{-K}^+]\text{ATP}$ asique de ce même segment est diminuée d'environ 70 % par rapport aux valeurs contrôles. Il s'est avéré que chez les animaux surrénalectomisés, nous avons effectivement observé une disparition quasi totale de la production de  $\text{CO}_2$  « ouabaine-sensible » par le tubule collecteur.

7) *Mesure des cations intracellulaires sur des segments tubulaires isolés*  
(R. RAJERISON, J. SUDO et F. MOREL)

Tout récemment, nous avons abordé le problème de la mesure de la concentration des cations intracellulaires  $[\text{Na}^+]$  et  $[\text{K}^+]$  dans des échantillons contenant un fragment tubulaire unique, incubé dans des conditions expérimentales variées.

Les fragments tubulaires sont obtenus par microdissection de tissu rénal prétraité à la collagénase, selon les modalités habituelles. La difficulté principale à surmonter dans ce type de mesure du contenu cationique intracellulaire réside dans la correction à introduire pour tenir compte des cations (principalement  $\text{Na}^+$ ) présents dans les liquides extracellulaires. Pour pallier cette difficulté, nous avons choisi de rincer les échantillons en les transférant dans trois bains successifs, à 0 °C, de solution isoosmotique de chlorure de choline complètement dépourvue de  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . Il a été vérifié que le contenu résiduel en  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  ne décroît pas lorsqu'on allonge la durée de ce rinçage de une à cinq minutes, ce qui atteste : a) une diffusion rapide et efficace des cations extracellulaires ( $< 1$  minute) et une diffusion très lente des cations intracellulaires à basse température (non décelable en cinq minutes). Une fois rincé, chaque fragment tubulaire est transféré sous huile avec 50 nl de solution de chlorure de choline, puis détruit par adjonction de



5 nl de TCA à 40 %. Après diffusion des cations intracellulaires, la concentration de ceux-ci est mesurée sur un volume constant (environ 20 nl), contre le même volume de solutions de référence, par microspectrophotométrie d'émission de flamme avec intégration du signal. L'appareil prototype utilisé a une sensibilité et une stabilité suffisantes pour permettre de mesurer avec une très bonne précision (SEM entre 10 pipettages différents d'une même solution =  $\pm 1,5$  % de la moyenne) des quantités de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{K}^+$  de l'ordre de 1 picoéquivalent par échantillon (un échantillon de tubule mesurant 0,3 mm contient environ 0,2 nl d'eau intracellulaire avec une concentration de  $\text{Na}^+$  de 10 mEq/l ; il contient donc bien  $2 \times 10^{-10} \text{ l} \cdot 1 \times 10^{-2} \text{ Eq Na/l}$ , soit  $2 \times 10^{-12} \text{ Eq Na}$ ). Les solutions standard donnent des réponses parfaitement linéaires dans le domaine des concentrations utilisées (0,05 à 1 mM). Les résultats sont exprimés soit par une unité de longueur tubulaire, soit par unité de volume tubulaire (longueur et volume des échantillons sont mesurés et calculés à partir de la photographie stéréomicroscopique prise pour tous les échantillons en fin d'incubation, juste avant le rinçage des tubules.

Jusqu'ici, cette méthode, qui fonctionne maintenant en routine, a été utilisée pour mesurer le contenu du tubule collecteur médullaire (MCT) ou du segment large ascendant (MAL) de rat, après équilibration *in vitro* à différentes températures (0-4 °C, 20, 25, 30 et 37 °C) dans un milieu apportant des substrats métaboliques.

Les résultats obtenus avec les MCT et les MAL sont différents. Sur les deux structures, les concentrations de Na et K se stabilisent très rapidement à des valeurs comparables, après incubation à 30 °C, à savoir (mEq par litre de volume cellulaire) : Na, 15 ; K, 90. Par contre, après trois heures ou plus à 0-4 °C, les cations sont inversés dans les MCT (Na : 70 à 80 mEq/l, K : 30 mEq/l), tandis qu'ils sont restés inchangés dans les MAL. Lorsque les MCT sont équilibrés à 20, 25 ou 37 °C, les concentrations trouvées sont identiques à celles mesurées à 30 °C.

En outre, lorsque des MCT équilibrés à basse température sont incubés à température élevée (20 à 37 °C, on observe un ajustement progressif de volume cellulaire, dont la vitesse (qui croît avec la température d'incubation) reste cependant beaucoup plus lente que celle avec laquelle K s'élève et Na s'abaisse dans le tissu. De telles variations de volume ne sont pas observées dans les échantillons de MAL. La publication de ces premiers résultats est en préparation (J. SUDO et F. MOREL). Les problèmes qu'ils soulèvent concernent la régulation du volume cellulaire et du contenu en cations alcalins dans les cellules épithéliales du rein. Ce programme de recherche est maintenant étudié par R. RAJERISON, depuis le retour de J. SUDO au Japon.

8) *Cultures primaires à partir de segments tubulaires isolés* (D. CHABARDES)

La quantité de cellules représentée par un segment isolé et maintenu en survie est parfois trop faible pour envisager certaines études de régulation hormonale (phosphorylation de protéines, concentration d'AMP cyclique sans inhibiteur de l'activité phosphodiésterasique...); le développement de cultures primaires de cellules épithéliales rénales a été entrepris pour essayer de pallier cet inconvénient. Les essais commencés par D. CHABARDES durant son séjour aux Etats-Unis (année 1982) et repris au laboratoire ont permis de cerner, mais non encore de résoudre complètement, les conditions expérimentales nécessaires à l'obtention de cultures primaires, développées dans des milieux définis, à partir de segments isolés par microdissection.

9) *Effet d'un traitement chronique à la vasopressine sur l'adényl-cyclase vasopressine-dépendante et la Na-K-ATPase du rein de rat Brattleboro en diabète insipide* (D. BUTLEN, A. DOUCET, G. EL MERNISSI, M. IMBERT-TEBOUL) en collaboration avec le groupe de L. BANKIR, Hôpital Necker, Paris

Nous mentionnerons enfin un travail utilisant plusieurs des approches indiquées ci-dessus et qui a été réalisé en collaboration avec le groupe de L. BANKIR de l'Hôpital Necker.

On sait que les rats Brattleboro, atteints d'un diabète insipide (DI) d'origine hypothalamique, répondent mal à l'injection de vasopressine exogène. Une injection unique d'hormone augmente la pression osmotique du tissu interstitiel médullaire, mais beaucoup moins que chez un rat normal, et le pouvoir de concentration du rein reste, de ce fait, très limité. Des études biochimiques réalisées ces dernières années par différents groupes ont montré que l'activité de l'adénylcyclase vasopressine-dépendante de fractions de médullaire rénale était plus faible chez les rats DI que chez les rats témoins. Nos propres résultats ont ensuite permis de préciser que le défaut enzymatique ne concernait pas le canal collecteur mais uniquement le segment large de la branche ascendante, autre site d'action de la vasopressine. Or le groupe de Lise BANKIR à l'Hôpital Necker a récemment observé (en collaboration avec le groupe de W. KRIZ en Allemagne) que, chez les rats DI, le volume des cellules du segment large était beaucoup plus faible dans la partie médullaire de l'anse que chez les rats témoins. Aucune différence morphologique n'est observée en revanche au niveau des canaux collecteurs ou dans la partie corticale du segment large. De plus, un traitement chronique à la vasopressine, capable, on le sait, de restaurer un pouvoir de concentration normal chez ces animaux, provoque une hypertrophie marquée et spécifique de la partie médullaire du segment large. Il était donc intéressant de rechercher si cette hypertrophie cellulaire s'accompagnait d'une restauration de l'activité adényl

cyclasique vasopressine-dépendente. Des expériences ont donc été faites en collaboration avec le groupe de Lise BANKIR sur des rats DI traités (ou non) à la vasopressine (DDAVP) pendant six semaines depuis l'âge de quinze jours. Le rein droit des animaux a été utilisé pour préparer des fractions membranaires de tissu médullaire et mesurer, en parallèle, l'activité adényl cyclasique vasopressine-dépendente et la liaison de vasopressine tritiée. Le rein gauche a été traité à la collagénase pour permettre la microdissection des segments larges et des canaux collecteurs et mesurer l'activité adényl cyclasique. L'activité Na-K-ATPasique a également été déterminée à titre de contrôle.

Les résultats montrent que le traitement à la DDAVP augmente environ deux fois l'activité adényl cyclasique sensible à la vasopressine contenue dans la partie médullaire du segment large, sans affecter celle contenue dans la partie corticale de l'anse, ou dans le canal collecteur. Cette augmentation d'activité s'accompagne (dans les fractions membranaires) d'une augmentation du nombre de récepteurs à l'hormone sans changement de la constante d'activation ( $K_A$ ) de l'enzyme. Elle n'est pas spécifique de l'AVP puisque l'adényl-cyclase sensible au glucagon augmente d'un même facteur, de même que l'activité Na-K-ATPasique. Nous observons, en outre, dans le canal collecteur : 1) une augmentation de l'activité Na-K-ATPasique d'un facteur 2, limité à la partie corticale du segment et, 2), une inhibition de l'adényl-cyclase sensible au glucagon tout le long du canal collecteur. Ces derniers résultats restent actuellement difficiles à interpréter.

Cette étude suggère, en conclusion, l'existence d'une relation entre activité adényl-cyclasique vasopressine-dépendente dans le segment large et constitution du gradient corticomédullaire de pression osmotique. Elle pose le problème de l'existence possible de liens entre activité adényl-cyclasique et activité ATPasique dans un même segment. Elle montre enfin la multiplicité des effets exercés sur le rein par un traitement chronique à la vasopressine et, de ce fait, elle explique la difficulté d'en comprendre le déterminisme à l'aide de ce que nous connaissons du mécanisme d'action de cette hormone.

## II. ÉQUIPE DE BIOPHYSIQUE DES MEMBRANES

(Responsable : Cl. GARY-BOBO ; chercheurs : Catherine THOMAS, Madeleine CASTAING ; technicien : Claude SAUTEREY)

*Transport ionique à travers des membranes lipidiques induit par des ligands macrocycliques de synthèse* (C. THOMAS, M. CASTAING et C. SAUTEREY)

Notre équipe constituée depuis peu, a entrepris une étude systématique des propriétés ionophoriques des « éthers couronnes » et des « cryptands » en

collaboration avec M. le Professeur LEHN qui en fait la synthèse dans son laboratoire.

L'utilisation de liposomes unilamellaires de grand diamètre (environ 0,2  $\mu$ ), obtenus par une méthode dérivée de celle de SZOKA et PAPAHDJOPoulos, fournit un système membranaire modèle plus défini et moins complexe que les membranes biologiques et à la fois plus proche d'elles que ne le sont les membranes liquides. Elle permet le contrôle non seulement des milieux ioniques interne et externe, mais aussi de la composition en lipides de la membrane elle-même.

La méthode utilisée, dont on peut d'ailleurs faire varier les modalités, consiste, après avoir imposé un gradient de pH de part et d'autre de la membrane contre un gradient inverse en cation à transporter, à mesurer dans le milieu externe le flux de protons induit par la présence du macrocycle.

A l'état quasi stationnaire du transport, les réactions de complexation-décomplexation se produisent aux deux interfaces et la diffusion se fait dans les deux sens.

S'il existe un gradient de concentration  $\Delta C = C_{ext} - C_{int}$  de part et d'autre de la membrane, un flux net de cations  $J_{net} = J_{interf.ext.} - J_{interf.int.}$ , peut s'établir à condition que l'électroneutralité soit respectée par exemple grâce à un échange en sens inverse avec des protons.

La vitesse du transport dépend à la fois du  $K_m$  de complexation (c'est-à-dire des réactions de complexation-décomplexation aux interfaces) et du coefficient de translocation du complexe à travers le double feuillet lipidique.

Comme il a été montré par ailleurs, en absence de transporteur, les vésicules utilisées sont légèrement perméables aux protons mais totalement imperméables aux ions phosphates, sulfates et aux cations. Avec uniquement ces ions dans les milieux interne et externe, le flux de protons observés ne peut provenir que de l'échange  $H^+ \rightleftharpoons$  cation induit par l'addition du macrocycle. En outre, ce flux de protons correspond à la vitesse du transporteur dans la membrane si c'est cette dernière qui est limitante : l'addition à forte concentration d'une protonophore comme le FCCP permet de s'en assurer.

Dans un premier temps, notre but a été d'analyser les propriétés et la capacité de transport ionique transmembranaire de deux composés mis à notre disposition, reportant à une étape ultérieure l'étude de la spécificité du transport. Il s'agit de deux cycles éthers couronnes comportant un squelette  $[15]O_5$  et un groupe latéral  $CON(C_8H_{17})_2$  identiques alors que le second groupe latéral adjacent et un groupe carboxylique libre pour l'un d'entre eux et un groupe  $CON(C_8H_{17})_2$  pour l'autre.

Sur des vésicules chargées négativement par l'introduction d'acide phosphatidique dans leur composition lipidique (lécithine 80 %, cholestérol 10%, acide phosphatidique 10 %, en moles) avec un gradient de pH de 1 unité, compris entre 6,5 et 7,5, et une gradient de concentration en  $\text{Na}^+$  compris entre 0,3 M et 0,7 M, nous avons étudié l'influence de la concentration de l'éther couronne carboxylé sur le transport de  $\text{Na}^+$ . Pour des concentrations du composé variant de  $1,25 \cdot 10^{-5}$  à  $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, les flux initiaux augmentent de 0,14  $\mu\text{moles}/\text{cm}^2/\text{h}$  à 17,45  $\mu\text{moles}/\text{cm}^2/\text{h}$  (constante de vitesse : respectivement  $2,63 \cdot 10^{-3} \text{ mn}^{-1}$  et  $3,34 \cdot 10^{-1} \text{ mn}^{-1}$ ).

La vitesse initiale est proportionnelle environ à la puissance 3/2 de la concentration de l'éther couronne, chiffre qui ne permet pas de conclure absolument à une stoechiométrie 1/1 du complexe avec  $\text{Na}^+$  plutôt qu'à un effet légèrement coopératif.

Pour toutes les concentrations et en fonction du temps, cette vitesse satisfait parfaitement une équation établie en tenant compte de la variation du degré de dissociation du tampon phosphate interne et correspondant à une diffusion simple. Le résultat était prévisible, les fortes concentrations de  $\text{Na}^+$  utilisées saturant tous les mécanismes autres que la diffusion. Plusieurs observations donnent à penser que ce serait une espèce neutre qui diffuserait : l'éther couronne porteur d'un carboxylate complexerait le sodium dans un sens et se protonnerait une fois le sodium relargué pour diffuser dans l'autre sens. En effet, 1) aucun terme électrique n'intervient dans l'équation établie ; 2) la vitesse est indépendante de l'addition ou non de FCCP ; 3) en l'absence de FCCP mais en présence de valinomycine (transporteur de  $\text{Na}^+$ ), l'addition de l'éther couronne augmente le flux de protons observé ; 4) le transport induit par l'éther couronne dont la fonction carboxylique est masquée exige, lui, l'addition de FCCP pour se produire.

La mise au point de l'appareillage nécessaire pour l'étude des propriétés électriques de bicouches lipidiques planes a été récemment réalisée.

Ces mesures doivent compléter les précédentes. Elles devraient nous permettre une étude rapide de la sélectivité du transport ionique, mais aussi de distinguer entre formation de pores et transporteur mobile et d'analyser les mécanismes de transport de façon détaillée.

## PUBLICATIONS

### I. ÉQUIPE DE PHYSIOLOGIE RÉNALE

Ph. POUJEOL, C. TOUVAY and D. CHABARDES, *Effect of Salmon calcitonin along the rat nephron : biochemical and physiological studies (Proceed.*

*Intern. Symp. Calcitonin*, in *Calcitonin*, 1980, Ed. A. Pecile, Series N° 540, 1981).

F. MOREL, *Regulation of Kidney Functions by hormones : a new approach (Laurentian Hormone Conf., Montréal, 1982 ; Recent Progress in Hormone Research*, 39, 271-304, 1983).

A. DOUCET et A.I. KATZ, *High affinity Ca-Mg-ATPase along the rabbit nephron (Amer. J. Physiol.*, 242, F346-F352, 1982).

J. MARCHETTI, M. IMBERT-TEBOUL, J. ALLEGRI and F. ALHENC-GELAS, *Kallikrein activity in the rabbit microdissected nephron. Localization to the granular distal part. Effect of deoxycorticosterone administrations (Communic. Congrès Néphrol. Soc. Fse., Espagnole et Italienne, Lyon, 22-24 oct. 1982).*

D. CHABARDES, M. MONTEGUT, M. IMBERT-TEBOUL and F. MOREL,  *$\alpha$  adrenergic agonist inhibits vasopressin (AVP) induced cAMP accumulation in the collecting tubule (The American Society of Nephrology, Chicago, Abstract 16, 158 A, 1982).*

A. DOUCET, J. MECKLER, G. EL MERNISSI et D. BEN-ISCHAY, *Na-K-ATPase in single nephron segments of hypertensionprone rats (J. of Hypertension*, 1, 53-56, 1983).

F. MOREL, J. SUDO, F. LE BOUFFANT et A. HUS-CITHAREL, *Métabolisme et transport d'ions de segments tubulaires isolés non perfusés (Association des Physiologistes, Physiologie rénale, Lyon 21-23 février 1983).*

D. CHABARDES, M. IMBERT-TEBOUL et M. MONTEGUT, *Inhibition par les agonistes  $\alpha$  adrénérgiques de l'action de la vasopressine sur le canal collecteur isolé (ibid.).*

G. EL MERNISSI et A. DOUCET, *Régulation de la Na-K-ATPase de segments isolés de néphron par les corticoïdes surrénaliens (ibid.).*

G. EL MERNISSI, D. CHABARDES, A. DOUCET, A. HUS-CITHAREL, M. IMBERT-TEBOUL, F. LE BOUFFANT, M. MONTEGUT, S. SIAUME et F. MOREL, *Changes in tubular basolateral membrane markers after chronic DOCA treatment (Am. J. Physiol.*, 1983, 245, F 100-F 109, 1983).

K. BADDOURI, D. BUTLEN, M. IMBERT-TEBOUL, F. LE BOUFFANT, J. MARCHETTI, D. CHABARDES and F. MOREL, *Plasma ADH levels and kidney responsiveness to vasopressin in the Jerboa *Jaculus orientalis* (General and Comparative Endocrinology, 1983, sous presse).*

D. BUTLEN, K. BADDOURI, R.M. RAJERISON, G. GUILLON, B. CANTAU and S. JARD, *Plasma ADH levels and liver vasopressin receptors on the Jerboa, *Jaculus orientalis* (General and Comparative Endocrinology, 1983, sous presse).*

II. ÉQUIPES DE « RÉCEPTEURS AUX NEUROMÉDIATEURS »  
ET D' « ENDOCRINOLOGIE MOLÉCULAIRE »

L. VELLE, B. CARDO and J. BOCKAERT, *Modulation of rat brain  $\alpha$  adreno-receptor populations by prior stimulation of the nucleus locus coeruleus (Phycho pharmacology, 74, 226-231, 1981).*

C. EBERSOLT, M. PEREZ, G. VASSENT and J. BOCKAERT, *Characteristics of the  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic sensitive adenylate cyclase in glial cell primary cultures and their comparison with  $\alpha_2$  adrenergic sensitive adenylate cyclase in a muscle cell-line (Brain Res., 213, 151-161, 1981 a).*

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

Y. TORRENS, R. MICHELOT, J.-C. BEAUJOUAN, J. GLOWINSKI and J. BOCKAERT, *In vivo biosynthesis of  $^{35}\text{S}$ -substance P from  $^{35}\text{S}$ -methionine in the rat striatum and its transport to the substantia nigra (J. Neurochem., 38, 1728-1734, 1982).*

H. GOZLAN, V. HOMBURGER, M. LUCAS and J. BOCKAERT, *Photoaffinity labelling of adrenergic receptors of  $C_6$  glioma cells. Presence of a nucleophilic group in the receptor (Biochem. Pharmacol., 31, 2879-2886, 1982).*

P. DETERRE, D. PAUPARDIN-TRITSCH, J. BOCKAERT and H.M. GERSCHENFELD, *cAMP mediated decrease in  $K^+$  conductance evoked by both serotonin and dopamine in the same neuron : a biochemical and physiological single cell study (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 79, 7934-7938, 1982).*

C. EBERSOLT, J. PREMONT, A. PROCHIANTZ, M. PEREZ and J. BOCKAERT, *Inhibition of brain adenylate cyclase by  $A_1$  adenosine receptors : Pharmacological characteristics and locations (Brain Res., 267, 123-129, 1983).*

P. DETERRE, H. GOZLAN and J. BOCKAERT, *GTP-dependent anion sensitive adenylate cyclase in snail ganglia. Potentiation of neurotransmitter effects (J. Biol. Chem., 258, 1467-1473, 1983).*

F. SLADACEZEK and J. BOCKAERT, *Turn-over in vivo of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in rat submaxillary glands (Mol. Pharmacol., 23, 282-288, 1983).*

A. ENJALBERT and J. BOCKAERT, *Pharmacological characterization of the  $D_2$  dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary (Mol. Pharmacol., 23, 576-585, 1983).*

M. SEBEN-PEREZ, C. EBERSOLT, G. BLANC and J. BOCKAERT,  *$\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenergic receptors in rat corpus striatum (Neurochem. Int., sous presse).*

J. PREMONT, M.C. DAGUET DE MONTETY, A. HERBERT, J. GLOWINSKI, J. BOCKAERT and A. PROCHIANTZ, *Biogenic amines and adenosine sensitive adenylate cyclases in primary cultures of striatal neurons (Brain Res., sous presse).*

G. GUILLON and D. BUTLEN, *Identification of two different species of vasopressin receptors on rat renal membranes (Proceed. VIIth European Symposium on Hormone and Cell regulation, Le Bischenberg, 1982).*

G. GUILLON, D. BUTLEN and B. CANTAU, *Kinetic and pharmacological characterization of vasopressin membrane receptors from human kidney medulla : relation to adenylate cyclase activation (Europ. J. Pharm., 85, 291-304, 1982).*

J. PENIT, M. FAURE and S. JARD, *Vasopressin and angiotensin II. Receptors in rat aorta smooth muscle cells in culture (Am. J. Physiol., 244, Endocr. Metab., 7, E72 - E82, 1983).*

S. JARD, *Vasopressin isoreceptors in mammals : relation to cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent transduction mechanisms (Current Topic in Membrane Transport, 18, 255-285, 1983).*

#### MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS SUR INVITATION

M. François MOREL a participé à la « Laurentian Hormone Conference » en septembre 1982, où il a fait un Exposé sur invitation, à paraître dans « Recent Progress in Hormone Research ». A cette occasion, il a fait un Exposé à l'Hôpital de Maisonneuve à Montréal. D'autre part, il a fait des conférences sur invitation, deux à l'Université de Chapel Hill et une à l'Université de Duke, Caroline du Nord, U.S.A., en mai 1983.

M. Alain DOUCET, à Fès en décembre 1982, ainsi que M. Daniel BUTLEN, à Rabat en mars 1983, ont été tous deux invités à faire une série de cours avancés de 3<sup>e</sup> Cycle.

M<sup>lle</sup> Danielle CHABARDES a terminé son séjour d'un an dans le Laboratoire du D<sup>r</sup> M. BURG (Bethesda, U.S.A.) en présentant une Communication à l'American Society of Nephrology, à Chicago, en décembre 1982.

M<sup>lle</sup> Jeanine MARCHETTI a été invitée, en février 1983 à une Gordon Research Conference portant sur « Kallikreins, kinins and other hypotensive peptides ».



M<sup>me</sup> Martine IMBERT-TEBOUL a été cosignataire d'un Rapport sur invitation présenté aux Actualités Néphrologiques de l'Hôpital Necker, en mai 1983.

M<sup>me</sup> Catherine THOMAS a effectué un stage technique dans le Laboratoire de M. GAVACH, à Montpellier, en septembre 1982.

M. Alain DOUCET a été invité à l'Institut Karolinska de Stockholm, en janvier 1983, à présenter un exposé de ses résultats.

#### DIPLOMES ET PROMOTIONS

M. Gilles GUILLON a reçu la Médaille de bronze du C.N.R.S.

M. Philippe DETERRE a passé sa Thèse de Doctorat ès Sciences.

M<sup>me</sup> Françoise LE BOUFFANT et M. Fritz SLADCESECK ont passé leur Thèse de 3<sup>e</sup> Cycle.

#### *GRUPE DE NEUROENDOCRINOLOGIE CELLULAIRE* *dirigé par M<sup>me</sup> TIXIER-VIDAL (Directeur de Recherche au C.N.R.S.)*

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

#### *I. MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DE LA SÉCRÉTION DE PROLACTINE*

L'analyse du processus sécrétoire de la prolactine, à l'aide d'outils immunologiques performants, a été poursuivie dans les cellules de la lignée GH3 ou dans des cellules à prolactine normales en culture primaire. On a analysé les effets sur la réponse au TRH des cellules GH3, de la monensine, ionophore carboxylique monovalent, capable de bloquer le transport des produits de sécrétion au niveau de la zone golgienne. Cette drogue réduit fortement la libération de prolactine dans le milieu en situation basale, mais n'affecte pas l'accroissement rapide de la libération induite par le TRH. La localisation par immunocytochimie ultrastructurale de la prolactine dans des cellules ainsi traitées révèle que la monensine induit l'accumulation dans la zone golgienne de larges vacuoles dont la face interne est tapissée de prolactine, suggérant une stase de l'hormone à ce niveau. Les mêmes images sont obser-

vées dans des cellules exposées au TRH, mais on note en outre de nombreuses petites vésicules chargées de prolactine. Ces résultats suggèrent l'existence possible de deux voies intracellulaires assurant respectivement la sécrétion basale ou stimulée de prolactine (TOUGARD et al, 1983).

La mise en œuvre d'anticorps dirigés contre des composants membranaires du reticulum endoplasmique rugueux (A-RER) d'une part, et contre une protéine majoritaire des membranes golgiennes (A-G) d'autre part (préparés par LOUVARD et al, 1982) a permis une dissection immunocytoologique des membranes intracellulaires impliquées dans le processus sécrétoire de la prolactine, dans les cellules GH3 et dans des cellules à prolactine normales. Dans les deux types de cellules, l'A-RER marque les membranes de la citerne périnucléaire et les citernes du reticulum rugueux. L'anticorps A-G marque les saccules médians des citernes golgiennes, ainsi que de nombreuses petites vésicules golgiennes et la membrane des lysosomes. De manière surprenante, il ne marque pas la membrane des grains de sécrétion, sauf au niveau de la zone golgienne et dans un très petit nombre de cas. Ces résultats révèlent une étroite compartimentation biochimique et/ou immunologique des membranes impliquées dans le processus sécrétoire. En outre, les mêmes outils appliqués à des cellules traitées par le TRH révèlent un flux de membranes golgiennes sous forme de petites vésicules venant s'insérer dans la membrane plastique (TOUGARD et al., 1983).

Des résultats préliminaires ont été publiés, concernant les mécanismes génomiques impliqués dans l'effet stimulant du TRH sur la synthèse de prolactine par les cellules GH3. Ils révèlent un effet très rapide, en trente minutes, du TRH sur la transcription du gène de la prolactine dans des cellules intactes. Cet effet, qui s'atténue après vingt heures, induit une accumulation de messagers dans le cytoplasme (MARTIAL et al, 1982).

Des résultats préliminaires ont été publiés montrant que les œstrogènes et la triiodothyronine régulent de façon inverse la réponse prolactinique des cellules GH3 au VIP d'une part et au TRH d'autre part. Ces résultats ont été mis en évidence grâce à l'emploi de milieu synthétique pour la culture de cellules GH3 (GOURDI et coll.).

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

Utilisant comme modèle une lignée hypothalamique primitive (F7), précédemment isolée après transformation par le SV 40 de cellules fœtales (DE VITRY et al., 1974), F. DE VITRY a mis en évidence le caractère de cellule précurseur bipotente de la lignée F7. Les potentialités neuronales de ces cellules avaient été précédemment révélées après passage *in vivo* (DE VITRY,

1977). De même, ces cellules sont capables de synthétiser des neuropeptides, la somatostatine et la met-enképhaline (CESSELIN et al., 1982). Les potentialités oligodendrocytaires de la lignée F7 ont été révélées grâce au transfert des cellules, pendant 2-3 jours, sur un milieu synthétique supplémenté en hormones. L'addition à ce milieu de cholestérol, de « eye derived growth factor » et d'extrait de cerveau, induit un changement du phénotype morphologique et l'acquisition de la capacité de synthétiser deux protéines oligodendrocytaires : l'anhydrase carbonique II et la protéine basique de la myéline (DE VITRY et coll., 1983). La lignée F7 apparaît donc comme une cellule souche capable d'orienter sa différenciation en réponse aux signaux du milieu extérieur.

Les recherches sur le développement de neurones hypothalamiques fœtaux cultivés en milieu synthétique ont conduit à une amélioration importante de la composition des milieux. Connaissant l'importance des acides gras polyinsaturés dans la composition des membranes synaptosomales, on a fait l'hypothèse que le milieu sans sérum pouvait induire des carences en acide gras dans les membranes des cellules cultivées. Cette hypothèse a été testée sur des cultures d'hémisphères cérébraux. L'analyse de la composition en acides gras des cellules cultivées sur ce milieu pendant 8 jours a révélé en effet une carence portant spécifiquement sur les acides gras polyinsaturés à chaîne longue, par rapport au tissu normal *in vivo* ou aux cellules cultivées en présence de sérum. L'essai de plusieurs combinaisons d'acides gras polyinsaturés ajoutés au milieu synthétique a permis de définir un mélange (22:6 - 22:4) capable de restaurer une composition normale en acides gras des membranes des cellules cultivées. Dans ces conditions, on observe un effet mitogène (200-300 %). Les cellules qui prolifèrent n'ont pas de propriétés neuronales et pourraient être des pré-oligodendrocytes (BOURRE et al., 1983). Ce mélange s'est avéré ensuite efficace, également pour la culture de cellules hypothalamiques et il est maintenant utilisé en routine pour l'étude du contrôle hormonal de la différenciation neuronale.

Dans le but de disposer d'un dosage très sensible au TRH pour étudier la biosynthèse et la libération de ce neuropeptide en culture, la sensibilité et la spécificité du dosage radioimmunologique précédemment établi (GROUSELLE et al., 1978) ont été accrues. L'emploi d'un standard monoiodé purifié a permis d'augmenter la sensibilité d'un facteur 5 (1 pg/tube) (GROUSELLE et al., 1982).

LISTE DES PUBLICATIONS

CESSELIN F., HAMON M., BOURGOIN S., BUISSON N. and DE VITRY F., *Presence of met-enkephalin in a somatostatin-synthesizing cell line derived from the fetal mouse hypothalamus (Neuropeptides, 2, 351-369, 1982).*

TIXIER-VIDAL A., MORIN A. et TOUGARD C., *Mécanismes cellulaires de la sécrétion de la prolactine.* Extrait du Colloque de la Société Nationale pour l'Etude de la Stérilité et de la Fécondité (« Prolactine, Neurotransmission et Fertilité », 67-74, 1982).

GROUSELLE D., TIXIER-VIDAL A. and PRADELLES P., *A new improvement of the sensitivity and specificity of radioimmunoassay for thyroliberin. Application to biological samples (Neuropeptides, 3, 29-44, 1982).*

GOURDJI D., LAVERRIÈRE J.N. et BRUNET N., *Sites de liaison des neuro-peptides régulant la cellule à prolactine. Couplage avec la réponse biologique.* Extrait du Colloque de la Société Nationale pour l'Etude de la Stérilité et de la Fécondité (« Prolactine, Neurotransmission et Fertilité », 107-116, 1982).

MARTIAL J., LAVERRIÈRE J.N. et MORIN A., *Structure et régulation du gène de la prolactine.* Extrait du Colloque de la Société Nationale pour l'Etude de la Stérilité et de la Fécondité (« Prolactine, Neurotransmission et Fertilité », 146-152, 1982).

DUFY B., ISRAEL J.M., ZYZEK E. and GOURDJI D., *Differential effect of  $K^+$ , TRH and VIP on the electrophysiological properties of pituitary cells in culture (Neuroendocrinology Letters, 4 (4) 245-252, 1982).*

TOUGARD C., PICART R., MORIN A. and TIXIER-VIDAL A., *Effect of monensin on secretory pathway in  $GH_3$  prolactin cells. A cytochemical study (J. Histochem. and Cytochem, 31 (6) 745-754, 1983).*

TOUGARD C., LOUWARD D., PICART R. and TIXIER-VIDAL A., *The rough endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus visualized using specific antibodies in normal and tumoral prolactin cells in culture (J. Cell Biol., 96 (5) 1197-1207, 1983).*

BOURRE J.M., FAIVRE-BAUMAN A., DUMONT O., NOUVELOT A., LOUDES C., PUYMIRAT J. et TIXIER-VIDAL A., *Influence de la supplémentation en acides gras de milieux de culture sur la morphologie et la composition des cultures de cellules fœtales de cerveau de souris (C.R. Acad. Sci., 296,629-632, 1983).*

DE VITRY F., DELAUNOY J.P., THIBAUT J., BUISSON N., LAMANDE N., LEGAULT L., DELASALLE A., and DUPOUEY P., *Induction of oligodendrocyte-*

*like properties in a primitive hypothalamic cell line by cholesterol, a retinal factor and brain extract* (EMBO J. 2, 199-203, 1983).

LOUDES C., FAIVRE-BAUMAN A., PUYMIRAT J. and TIXIER-VIDAL A., *Effect of hormones on the development of mouse fetal hypothalamic neurons in vitro* (in « *Drugs and Hormones in Brain Development* », SCHLUMPF M. and LICHTENSTEIGER W. eds, *Monogr. neural Sci.*, 9, 43-49, Karger, Basel, 1983).

#### CONGRÈS

Colloque International sur le Radioimmunos dosage et les méthodes connexes en Médecine, Autriche, juin 1982.

EMBO Workshop : « *Molecular Mechanisms of Nervous System Development* » Strasbourg, juin 1982.

International Society of Developmental Neuroscience, Patras, juillet 1982.

30<sup>e</sup> Réunion de la Société Européenne de la Culture de Tissus, Paris, juillet 1982.

1<sup>er</sup> Congrès Européen de Biologie Cellulaire, Paris, juillet 1982.

Symposium Européen I.N.S.E.R.M. « *Régulations Cellulaires Multihormonales en Neuroendocrinologie* », Colmar, septembre 1982.

Colloque de la Société Nationale pour l'Etude de la Fertilité et de la Stérilité, Paris, septembre 1982.

Conférence I.N.S.E.R.M. « *Mécanismes Moléculaires et Cellulaires de la Sécrétion des Hormones Peptidiques* », Seillac, octobre 1982.

First European Conference on Serum Free Culture, Heidelberg, octobre 1982.

Colloque de l'A.T.P. « *Biologie Moléculaire du Gène* », Font Romeu, novembre 1982.

31<sup>e</sup> Réunion de la Société Européenne de la Culture de Tissus, Budapest, mai 1983.

EMBO Workshop « *Role of Cell Interaction in Early Neurogenesis* » Cargese, juin 1983.

14<sup>e</sup> Rencontre de Méribel (C.N.R.S.), mars 1983.

Table Ronde de Neuropathologie, M.I.R., Paris, juin 1983.

5° Symposium International sur les Catécholamines, Goteborg, juin 1983.

PARTICIPATION A L'ENSEIGNEMENT UNIVERSITAIRE

AEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire : D. GOURDJI.

DEA de Physiologie de la Reproduction : A. TIXIER-VIDAL.

DEA de Biologie Cellulaire, Orsay : C. TOUGARD.

Cours de Cytochimie Ultrastructurale, Institut Pasteur : C. TOUGARD.

S.E.T.A.R. (Université des Cordeliers) : C. TOUGARD.

AEA d'Endocrinologie Université de Rouen : D. GOURDJI.

Séminaire Technique I.N.S.E.R.M. sur les Matrices Extracellulaires, Paris :  
N. BRUNET et A. FAIVRE.