

## Physiologie cellulaire

M. François MOREL, professeur

Le cours a porté, cette année, sur la « régulation de la concentration des électrolytes intracellulaires ».

On sait que les concentrations intracellulaires des cations alcalins chez les eucaryotes sont caractérisées par une valeur élevée pour le potassium (de l'ordre de 100 mEq/L) et basse pour le sodium (de 10 à 20 mEq/L), à l'inverse de celles qui existent dans le milieu extracellulaire (5 et 145 mEq/L pour  $K^+$  et  $Na^+$ , respectivement). Pour maintenir de tels gradients électrochimiques à travers leur membrane à l'état stationnaire, les cellules expulsent continuellement des ions  $Na^+$  par un mécanisme de pompage endergonique (Na-K-ATPase) qui compense exactement les pertes qui se produisent par diffusion passive.

Il a été observé, au moins sur divers types de cellules, que les concentrations intracellulaires de sodium et de potassium restent invariables lorsque la température est abaissée de 37 °C jusqu'à des valeurs basses, égales même à 0 °C dans certains cas. Comme les mécanismes impliqués dans la balance des échanges ioniques entre la cellule et son milieu comportent deux composantes de nature différente — l'une passive, diffusionnelle, l'autre active, endergonique —, on attendrait une atténuation des gradients de concentration de sodium et de potassium lorsque la température s'abaisse : en effet, les flux diffusionnels varient proportionnellement à la température absolue, alors que le transport actif d'ions (qui compense exactement les pertes par diffusion à la température normale) possède une énergie d'activation élevée et voit donc sa vitesse décroître de 2 à 3 fois lorsque la température baisse de 10 °C ( $Q_{10}$ ).

L'observation rappelée ci-dessus est donc paradoxale sur le plan thermodynamique, tout au moins en première analyse, même si elle représente une nécessité physiologique, au moins pour les multiples espèces hétéothermes qui sont actives même lorsque leur température corporelle varie dans des limites importantes.

\*  
\*\*

En 1972, I. REISEN et J. GULATI publiaient deux articles dans *Science* (Vol. 176, p. 1137-1139 et 1139-1141), intitulés respectivement « Cooperative critical thermal transition of potassium accumulation in smooth muscle », et « Cooperative thermal effects on the accumulation of potassium and sodium in frog muscle ».

Le premier travail, effectué sur le muscle lisse intestinal de mammifère, montre qu'à l'état stationnaire et pour une concentration de  $K^+$  externe de 5 mEq/L, les contenus intracellulaires en cations alcalins varient en fonction de la température selon deux courbes en miroir comportant, entre 8 et 16 °C, une portion sigmoïde accusée, et un plateau entre 15 et 37 °C. Si la concentration du potassium du milieu est augmentée à 10 mEq/L, la température critique de transition (point d'inflexion des courbes sigmoïdes) s'abaisse de 13,8 à 10 °C. Les auteurs interprètent leurs résultats expérimentaux dans le cadre de la théorie de G.N. Ling et postulent qu'ils reflètent des « isothermes d'adsorption coopérative » des ions  $K^+$  et  $Na^+$  sur des charges négatives non diffusibles du cytoplasme. Cette théorie, qui ignore la membrane cellulaire et ses fonctions, rendrait parfaitement compte des résultats obtenus, et serait donc, pour les auteurs, validée de ce fait.

Le deuxième article des mêmes auteurs étudie les effets de la température sur le muscle strié d'une espèce hétérotherme, la Grenouille. Des muscles préalablement déplétés de leur potassium (par une incubation en l'absence de  $K$  externe) sont ensuite maintenus pendant 70 heures à 0 °C en présence de différentes concentrations de potassium (0 à 10 mEq/L) : on note alors qu'une fraction variable du sodium intracellulaire a été remplacée par du potassium, selon une courbe qui satisfait également la théorie de Ling ; dans ce cas, cependant, la température critique de transition est plus basse (entre 0 et 2 °C) et l'affinité relative des ions  $K^+$  (par rapport aux ions  $Na^+$ ) pour les sites anioniques fixes du cytoplasme est plus élevée que chez l'espèce homéotherme étudiée ci-dessus.

Nous avons analysé et discuté ces deux articles en détail au cours, parce qu'ils sont intéressants à plusieurs titres ; il est remarquable, d'abord, qu'il ait été possible il y a une douzaine d'années à peine d'interpréter ces résultats expérimentaux dans un cadre conceptuel qui ignore complètement la membrane plasmique cellulaire et les propriétés de perméabilité spécifique, de transport ionique et de polarisation électrique qui lui sont associées. L'adéquation obtenue entre les résultats et une isotherme d'adsorption coopérative ne saurait, bien entendu, constituer en soi une preuve du bien-fondé de la théorie proposée par Ling. D'autres mécanismes physico-chimiques peuvent

également conduire à ce type de courbes coopératives en fonction de la température, même si leur formalisation mathématique n'est pas nécessairement facile ou possible aujourd'hui. Encore convient-il d'interpréter ces résultats expérimentaux (et d'autres de même nature) dans le cadre des propriétés des membranes cellulaires. Or, nous l'avons mentionné déjà, le maintien d'une concentration intracellulaire de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{K}^+$  constante dans une large plage de température n'est pas immédiatement explicable par la simple résultante algébrique de flux transmembranaires passifs et actifs indépendants. Avant d'envisager l'existence d'une régulation de la concentration des ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  en tant que telle, il importe d'analyser avec précision ce que l'on sait des mécanismes de perméation (« active » ou « passive ») de ces deux espèces ioniques à travers les membranes plasmiques et de la façon dont ces mécanismes sont assujettis aux variations des paramètres de leur environnement, notamment de la température. Il s'agit là de problèmes complexes et en évolution rapide, dont une partie seulement a pu être traitée dans le cours de cette année, celle portant sur les mécanismes de perméation passive et « électrogénique » le long de voies « conductives » au sens des électrophysiologistes (canaux à sodium et à potassium).

\*  
\*\*

On sait qu'il existe dans les tissus excitables une « conductance » au sodium susceptible d'augmenter brusquement et transitoirement soit sous l'influence de médiateurs chimiques (canal sodique associé au récepteur cholinergique, par exemple) soit lorsque la membrane dépasse un certain niveau de dépolarisation électrique (canal à sodium impliqué dans la conduction). Dans le deuxième cas mentionné, celui des canaux dont l'ouverture est voltage-dépendante, HODGKIN et HUXLEY (*J. Physiol.*, London, 117, 500-544, 1952) avaient suggéré que l'ouverture du canal correspondrait à un déplacement de charges intramembranaires. La vérification expérimentale de cette hypothèse a été administrée par plusieurs équipes en 1973. Ces équipes démontrèrent que, lors d'une dépolarisation imposée de la membrane, le courant enregistré comporte effectivement une composante transitoire capacitive (qui correspond donc à un déplacement de charges) dont les caractéristiques suivantes prouvent qu'elle est liée spécifiquement à l'ouverture de ce type de canaux à sodium : 1) le courant d'ouverture de porte (« gating current ») n'est observé que dans le cas des canaux voltage-dépendants ; 2) le courant existe même lorsque le courant ionique de sodium à travers le canal a été bloqué par la tétrodontoxine ; 3) les décours temporels du courant d'ouverture et du courant d'ions sodium sont compatibles avec l'hypothèse que plusieurs charges indépendantes doivent subir une translocation dans la membrane pour entraîner l'ouverture du canal (décours exponentiel pour le courant d'ouverture, sigmoïde pour le courant ionique) ; 4) lors de la repolarisation membranaire, on note un courant de

fermeture des canaux, dirigé en sens inverse du courant d'ouverture, alors que le courant ionique ne change pas de sens ; enfin, 5) le courant ionique décroît plus rapidement que le courant de fermeture lors de la repolarisation, ce qui indique que les canaux se ferment avant que toutes les charges déplacées lors de l'ouverture aient regagné leur position de repos.

Les études électrophysiologiques des dernières années ont donc permis de mieux comprendre les mécanismes d'ouverture et d'inactivation des canaux à sodium des membranes excitables, et, plus particulièrement, elles ont permis de préciser la nature du couplage entre potentiel de membrane et ouverture du canal. Tous ces aspects ont été discutés en détail au cours pour les canaux à sodium comme pour les canaux à potassium.

A ce stade de notre discussion, il apparaît donc que des flux diffusionnels de perméation passive d'ions existent, dont l'intensité est contrôlée par le voltage membranaire via un déplacement de charges commandant l'ouverture et la fermeture de « canaux », ou encore, pour les canaux ouverts, via un mécanisme d'inactivation, différent de celui de fermeture, mais localisé comme lui sur la face intracellulaire de la membrane. La description électrophysiologique des canaux ioniques impose une remarque ; cette description repose sur des résultats expérimentaux certes précis et quantitatifs, mais indirects et statistiques ; des diagrammes d'état compatibles avec les données expérimentales en ont été déduits, qui ne représentent qu'une formalisation des propriétés observées, la plus simple possible ; enfin, à partir de ces diagrammes, des modèles géométriques (« canaux ») ont été proposés, faute de connaître encore la conformation exacte des structures moléculaires correspondantes. Sur le plan physiologique, un canal ionique représente une région discrète de la membrane traversée par des protéines intégrales dont la présence et les propriétés ont pour conséquences de permettre le passage sélectif d'une (ou plusieurs) espèce(s) ionique(s) à travers la phase de la membrane. Le « canal ionique » partage diverses propriétés avec les enzymes : diminution de la barrière d'énergie de la réaction catalysée ; cinétique de saturation en fonction de la concentration de l'ion perméant ; spécificité vis-à-vis de l'espèce ionique diffusible ; inhibition compétitive par des analogues de structure (agents bloquants) ; enfin, activité fonctionnelle contrôlée par des changements conformationnels. Un canal se distingue des enzymes à d'autres égards : translocation au lieu de transformation du substrat ; intensité du processus catalysé (flux ionique) parfois très élevée ( $10^6$  à  $10^9$  ions/sec) ; dépendance thermique de la réaction généralement faible ( $Q_{10}$  de 1,2 à 1,4 correspondant à une énergie d'activation de 3 à 6 KCal/mole). Ces deux dernières propriétés indiquent que le canal doit correspondre à un « pore hydrophile de structure rigide » laissant passer les ions par diffusion à travers un filtre de sélectivité, l'ensemble du processus impliquant beaucoup moins d'énergie que lorsqu'un changement de conformation de protéine est associé à la translocation ionique.

\*  
\*\*

L'analyse expérimentale des canaux ioniques est devenue possible à l'échelle unitaire depuis que NEHER a introduit en 1981 la méthode dite de « patch clamp ». La surface de membrane étudiée par méthode électrophysiologique est réduite au point de ne comporter que quelques canaux ioniques, voire un seul, dont l'ouverture et la fermeture individuelles peuvent être observées et enregistrées en fonction du temps. Une variante de la méthode consiste à insérer dans une membrane artificielle un ou quelques canaux ioniques après solubilisation appropriée. Ces recherches se sont très rapidement multipliées et ont permis de classer les canaux ioniques en fonction de leur conduction unitaire. Celle-ci peut varier de 5 à 500 picoSiemens par canal, selon la classe considérée. En général, la sélectivité est meilleure quand la conductance est faible. Réciproquement, les canaux de conductance élevée (100 à 500 pS) sont peu spécifiques. Une catégorie, cependant, associe une conductance élevée (100 à 250 pS) à une bonne spécificité pour l'ion potassium : il s'agit des « maxi-canaux » à potassium. Ceux-ci sont d'autant plus intéressants qu'ils ont été récemment observés dans la membrane de types cellulaires très variés, y compris dans celle de cellules non excitables comme les lymphocytes par exemple. Les maxi-canaux à  $K^+$  sont non seulement voltage-dépendants, mais souvent aussi calcium-dépendants, ce qui leur confère évidemment des fonctions régulatrices particulièrement intéressantes sur le plan physiologique.

L'étude unitaire des canaux ioniques a permis de montrer leur comportement ohmique (lorsque le canal est ouvert), ce qui confirme le caractère diffusif du flux ionique qui les parcourt. Il en résulte que le flux ionique s'effectuant dans un canal ouvert devrait être peu affecté par la température. Par contre, le processus d'ouverture du canal pourrait dépendre fortement de la température, puisqu'il implique des changements conformationnels des protéines qui constituent le canal (mouvement de charges négatives dans la membrane pour l'ouverture dépendante du voltage, déplacement de chaînes peptidiques sur la face cytoplasmique pour l'inactivation des canaux ouverts).

La dépendance thermique de ces diverses composantes a été effectivement analysée récemment par BEAM et DONALDSON (*J. Gen. Physiol.*, 81, 485-512, 1983) dans le cas de la membrane de la fibre musculaire striée. Cette membrane contient des canaux à potassium dont le comportement est ohmique et dont l'ouverture dépend du voltage. Lorsque les expériences sont répétées à des températures décroissantes, les courbes sigmoïdes liant la conductance relative au voltage membranaire sont déplacées vers la droite, ce qui montre qu'à un voltage donné, la conductance relative (donc la fraction des canaux qui sont ouverts) s'abaisse lorsque la température s'abaisse. De même, les cinétiques d'ouverture des canaux à potassium en fonction du temps après

application d'un pulse dépolarisant sont d'autant plus retardées et aplaties que la température est plus basse. En coordonnée d'Arrhénius, la courbe obtenue est incurvée et sa pente augmente vers les basses températures. Les  $Q_{10}$  qui lui correspondent passent de 2 à 6 entre 39° et 4 °C. Par contre, la conductance maximale obtenue varie peu avec la température, ce qui indique que la conductance unitaire du canal ouvert est peu affectée par les variations de température : le  $Q_{10}$  correspondant est de 1.42, peu différent de celui décrivant la variation de la conductance de l'ion  $K^+$  dans l'eau entre 0 et 25 °C ( $Q_{10} = 1.28$ ).

\*  
\*\*

En conclusion, l'analyse qui précède résume quelques-uns des problèmes traités au cours de cette année ; elle montre que parmi les divers mécanismes passifs de perméation ionique qui se produisent au travers des membranes, ceux qui s'effectuent le long des canaux ioniques présentent bien certains caractères attendus de processus diffusionnels ; les courants d'ions unitaires dans les canaux ouverts sont effectivement peu affectés par la température. Cependant, la conformation des canaux eux-mêmes change spécifiquement en fonction de divers facteurs d'environnement, tels que le champ électrique au travers de la membrane, le pH intracellulaire ou la concentration du calcium ionisé dans la cellule. Ces changements conformationnels entraînent l'ouverture ou la fermeture des canaux individuels par un mécanisme de tout ou rien. A l'échelle de la cellule entière, c'est-à-dire d'une population très nombreuse de canaux, on obtient évidemment des courbes de conductance moyenne en fonction de la variation de ces paramètres, dont il est aisé de montrer qu'elles traduisent bien la résultante statistique globale des comportements unitaires observés.

Malgré leur caractère diffusionnel simple dans le sens du gradient électrochimique, on voit donc que les flux passifs d'ions sont susceptibles de varier quantitativement en fonction du temps par suite d'altération dans la structure des canaux qui les permettent. Ces changements conformationnels correspondent à des mécanismes régulateurs ; des paramètres comme le pH, le calcium ionisé cellulaire ou le voltage de la membrane agissent comme signaux régulateurs, et ceci a été montré aussi bien dans des cellules non excitables que dans les cellules nerveuses et musculaires généralement étudiées. Enfin, lorsque la température est abaissée, la perméabilité membranaire décroît fortement, car la probabilité d'ouverture des canaux diminue. Tous ces facteurs contribuent évidemment à maintenir constante la composition intracellulaire des cations alcalins lorsque la température du milieu varie.

F. M.

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

Programme des séminaires :

13 janvier : M. Ricardo GARAY : Systèmes de transport des cations dans les globules rouges humains.

20 janvier : M. Claude BERGMAN : Voltage dépendance de la réponse électrogène aux acides aminés.

27 janvier : M. Michel CLARET : Régulation hormonale du Calcium cytosolique dans les hépatocytes.

3 février : M. Ricardo GARAY : Régulation du transport de Na et K par les prostaglandines dans les macrophages.

10 février : M. B.J. HARVEY : Application des microélectrodes sensibles aux ions dans les épithéliums.

24 février : M. PARISI : Effet du pH sur la perméabilité apicale à l'eau de l'épithélium de vessie d'Amphibien.

2 mars : M. René MOTAIS : Régulation par les catécholamines du volume des globules rouges de truite.

#### TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Les travaux de recherche poursuivis dans le laboratoire de Physiologie cellulaire sont consacrés pour l'essentiel à l'étude de la régulation des fonctions d'excrétion du rein, analysées à l'échelle des segments tubulaires qui constituent les néphrons. Cette approche permet tout à la fois de surmonter et d'analyser l'extrême hétérogénéité fonctionnelle du rein à l'échelle cellulaire. Elle a nécessité la mise au point de toute une série de microméthodes, propres au laboratoire, qui sont adaptées aux dimensions très réduites des fragments individuels de tubule que l'on obtient par microdissection des néphrons après traitement du tissu par la collagénase.

Les programmes en cours d'étude, et dont plusieurs sont développés avec quelques détails ci-dessous, portent, pour la plupart, sur l'analyse du contrôle exercé par diverses hormones. Certains programmes étudient les propriétés de récepteurs hormonaux ou mesurent des activités enzymatiques après destruction des structures cellulaires (adénylate cyclase hormone-dépendante, kallikréine, kininases, Na-K-ATPase, etc.). D'autres mesurent des fonctions physiologiques sur tubules isolés en survie *in vitro* (production endogène d'AMP cyclique, de prostaglandine ; production métabolique de  $^{14}\text{CO}_2$  à partir de

divers substrats uniformément marqués ; mesure des cations alcalins intracellulaires).

En plus de cette activité principale de recherche, un petit groupe en voie de constitution analyse les propriétés de sélectivité et de transport des kryptates de synthèse (provenant du laboratoire de Chimie des Interactions moléculaires) sur des systèmes membranaires artificiels (liposomes, membranes « noires ») ou sur des membranes cellulaires (hématies).

## I. ÉQUIPE DE PHYSIOLOGIE RÉNALE

### 1) *Cultures cellulaires primaires à partir de segments isolés par microdissection* (Danielle CHABARDÈS, May FAURE)

Cette technique a été développée au laboratoire en 1983 après avoir été apprise aux Etats-Unis (stage d'un an de D. CHABARDÈS en 1982). Les résultats acquis, bien que préliminaires, permettent une base de réflexion :

Le tubule proximal, de même que les parties corticales de la branche large ascendante de l'anse de Henlé et du canal collecteur, microdissequés à partir de reins de lapin, permettent d'obtenir des cultures primaires dans un milieu défini en absence de toute addition de sérum.

Après huit jours en culture, la sensibilité hormonale des colonies, testée par dosage de l'activité adényl-cyclasique, indique une action maintenue sur les cellules obtenues à partir du canal collecteur (facteurs de stimulation de 3 à 6 par l'hormone antidiurétique), et sur celles obtenues à partir du tubule proximal (facteur de stimulation de 2 à 3 par l'hormone parathyroïdienne, PTH) ; les expériences réalisées sur les cultures issues de la branche ascendante de l'anse sont jusque-là négatives. Quel que soit le type cellulaire étudié, la Forskoline induit pourtant une importante stimulation (1 à 15 fois) de l'activité adénylcyclasique, ce qui montre que l'unité catalytique de l'enzyme est parfaitement fonctionnelle.

Les facteurs de stimulation observés avec l'AVP et la PTH sont beaucoup plus faibles que ceux normalement obtenus sur des segments isolés. Une dédifférentiation importante s'est donc produite après huit jours de culture primaire. Malgré cette observation, l'obtention reproductible de cultures dans un milieu parfaitement défini peut permettre d'étudier des facteurs potentiellement importants pour la différenciation cellulaire et la sensibilité hormonale. Afin de mieux cerner ces problèmes, de nouveaux essais sont envisagés qui seront faits sur des supports perméables aux milieux de culture afin de préserver la polarité cellulaire, facteur probablement essentiel dans le cas des cellules épithéliales étudiées.

2) *Mesure de la synthèse de prostaglandine (PGE<sub>2</sub>) par des canaux collecteurs isolés de rat* (M. IMBERT-TEBOUL et S. SIAUME)

Il est maintenant bien établi que les cellules épithéliales du canal collecteur sont capables de synthétiser des prostaglandines. Le taux de synthèse n'a cependant pas encore été mesuré sur des tubules intacts et l'on ignore si les facteurs modulant la synthèse de PGE<sub>2</sub> par les cellules interstitielles de la médullaire rénale modulent également celle du canal collecteur. Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons mis au point un dosage radioimmunologique, miniaturisé par rapport aux techniques usuelles, qui permet de mesurer la quantité de PGE<sub>2</sub> produite par un segment unique de canal collecteur de rat, maintenu en survie *in vitro*. La méthode permet de doser avec une bonne précision de quantités de PGE<sub>2</sub> comprises entre 0,05 et 5 picogrammes par échantillon. Cette sensibilité apparaît suffisante pour mesurer la synthèse de PGE<sub>2</sub> d'un fragment unique de canal collecteur de moins de 1 mm de long (qui produit environ 1 pg/mm/15 min à 37 °C).

Nous travaillons actuellement à normaliser les taux de synthèse des PGE<sub>2</sub> qui sont encore trop variables d'un échantillon à l'autre et d'un animal à l'autre. En effet, l'anoxie et les différents traitements imposés au tissu augmentent fortement et irrégulièrement la synthèse de PGE<sub>2</sub> *in vitro* et il est essentiel de la ramener à un niveau de base faible et stable pour espérer détecter une éventuelle stimulation hormonale.

3) *Contrôle de la Na-K-ATPase par les hormones thyroïdiennes* (A. DOUCET, C. BARLET)

Il a été démontré depuis longtemps que l'activité de la Na-K-ATPase rénale est abaissée chez les animaux hypothyroïdiens et est stimulée par l'administration de triiodothyronine (T<sub>3</sub>). Ces effets sont accompagnés de changements de la filtration glomérulaire et de la capacité de réabsorption du sodium. Curieusement, il n'existe à ce jour aucune donnée sur les sites et les mécanismes d'action de la T<sub>3</sub> sur l'activité de la Na-K-ATPase le long du néphron. D'autre part, sur la vessie d'amphibien (un épithélium ayant des propriétés similaires à celles du tubule collecteur des mammifères), il a été montré que la T<sub>3</sub> antagonise les effets de l'aldostérone.

Afin d'analyser ces différents problèmes, nous avons entrepris de caractériser les effets de la T<sub>3</sub> sur la Na-K-ATPase au niveau de segments isolés de néphron. Nous envisageons d'étudier par la suite les interactions T<sub>3</sub>-aldostérone au niveau du tubule collecteur.

Les premiers résultats indiquent que, chez le lapin, la thyroïdectomie entraîne une diminution parallèle de l'activité Na-K-ATPase et de nombre de sites catalytiques (sans changement de l'activité spécifique) dans le tubule

proximal et le canal collecteur, alors que l'enzyme n'est pas affectée dans les autres segments du néphron (anse large ascendante et tubule contourné distal). L'administration de  $T_3$  à des doses égales ou supérieures à 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  restaure, après 48 heures, l'activité et le nombre de sites catalytiques des segments cibles de l'hormone. Pour des doses de  $T_3$  comprises entre 10 et 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , on observe une dissociation entre l'activité de l'enzyme (qui n'est pas modifiée) et le nombre de sites catalytiques (qui est augmenté) ; ceci suggère que la  $T_3$  d'une part induit la néosynthèse de l'enzyme et d'autre part ferait apparaître un inhibiteur endogène de l'activité Na-K-ATPase. Les mécanismes sous-jacents à ces phénomènes sont actuellement étudiés.

4) *Etude de l'ATPase anionique membranaire du rein* (A. DOUCET, M. BEN ABDELKHALEK)

Le rôle et l'existence même d'une ATPase anionique membranaire dans les cellules rénales demeurent aujourd'hui controversés. En effet, si de nombreux auteurs ont montré l'existence d'une activité ATPase stimulée par l'ion bicarbonate ( $\text{HCO}_3\text{-ATPase}$ ) dans des fractions membranaires (bordures en brosse) isolées à partir de cortex rénal, il n'a jamais été clairement prouvé que cette activité n'était pas due à une contamination mitochondriale de la fraction membranaire.

Nous avons repris ce problème — non pas en essayant de purifier au maximum les fractions membranaires pour se débarrasser d'une éventuelle contamination mitochondriale — mais en essayant de trouver des caractéristiques pharmacologiques et cinétiques qui permettent de distinguer les activités d'origine mitochondriale et membranaire.

Les résultats des études pharmacologiques indiquent qu'il existe une activité  $\text{HCO}_3\text{-ATPase}$  dans les fractions membranaires corticales et médullaires qui est : 1) insensible à l'azide de sodium, 2) insensible à l'oligomycine, 3) insensible au thiocyanate, 4) sensible à la filipine. Inversement, l'ATPase mitochondriale est sensible à l'azide, à l'oligomycine et au thiocyanate et est insensible à la filipine. Ces résultats démontrent clairement que les  $\text{HCO}_3\text{-ATPases}$  d'origine mitochondriale et membranaire sont deux entités moléculaires différentes. A ces différences pharmacologiques, s'ajoutent des caractéristiques cinétiques spécifiques, en particulier vis-à-vis du bicarbonate et du magnésium.

Dès lors, en utilisant les inhibiteurs spécifiques de la  $\text{HCO}_3\text{-ATPase}$  mitochondriale, il a été possible de mesurer l'activité  $\text{HCO}_3\text{-ATPase}$  membranaire sur des segments isolés de néphron, grâce à la microméthode utilisée pour mesurer la Na-K-ATPase.

Chez le lapin, l'activité de la  $\text{HCO}_3\text{-ATPase}$  est localisée principalement dans le tubule proximal, le tubule connecteur et le canal collecteur cortical.

L'activité est faible dans le tubule contourné distal et la partie médullaire du canal collecteur. Enfin, aucune activité n'est détectée au niveau de l'anse large ascendante.

Le rôle de cette enzyme dans les transports ioniques demeure inconnu. Il a été proposé qu'elle pourrait avoir un rôle dans la sécrétion de protons. A cet égard, il est intéressant de noter que nous avons observé une stimulation de son activité spécifiquement dans les segments distaux de néphron de lapins traités pendant plusieurs jours avec de la DOCA.

### 5) *Caractérisation d'une K-ATPase rénale* (A. DOUCET)

Des études préliminaires nous ont permis de démontrer l'existence d'une activité ATPasique potassium-dépendante (K-ATPase) dans la partie terminale du tubule contourné distal (DCTg) et dans le tubule collecteur cortical (CCT) du lapin. L'activité de cette enzyme n'est pas détectée sur des fractions membranaires préparées à partir de cortex rénal car les segments de DCTg et de CCT constituent une fraction mineure de ces préparations. C'est donc seulement au niveau de segments isolés de néphron qu'il a été possible de caractériser cette enzyme qui par ailleurs a été décrite dans les cellules pariétales gastriques où elle effectuerait un échange  $K^+-H^+$  et interviendrait dans la sécrétion gastrique d'HCl.

D'un point de vue morphologique, les segments de DCTg et de CCT sont, chez le lapin, tous deux constitués de deux types cellulaires distincts, dont l'un, les cellules sombres, est commun à ces deux segments. Il semble donc probable que la K-ATPase rénale soit localisée dans ce type cellulaire, qui présente d'ailleurs des similarités ultrastructurales avec les cellules intercalaires gastriques. Ces cellules sombres contiennent une adénylate cyclase sensible aux catécholamines. De ce fait, il semble possible que la K-ATPase présente dans ces cellules soit contrôlée par les catécholamines puisqu'il a été démontré récemment que l'isoprotérénol contrôle le transport actif de chlorure dans ce segment.

Nos études actuelles visent à déterminer les caractéristiques de cette K-ATPase. A l'heure actuelle, nous avons déterminé son  $K_m$  vis-à-vis du potassium (0.1-0.5 mM) et prouvé qu'elle est insensible à l'ouabaïne et aux inhibiteurs mitochondriaux (azide, oligomycine). Nous envisageons ultérieurement d'étudier son rôle physiologique grâce à l'utilisation d'Omeprazole, substance pharmacologique qui s'est révélée être un inhibiteur spécifique de la K-ATPase gastrique.

### 6) *Contenu cationique de tubules isolés* (R. RAJERISON et M. FAURE)

Depuis les premières expériences décrites dans notre précédent rapport, nous avons entrepris une analyse systématique des effets de la température,

de la concentration du potassium dans le milieu et d'agents pharmacologiques comme l'ouabaine, l'amiloride et le furosemide sur les contenus en  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  de MCT et de MAL de rats incubés *in vitro*. Les principales observations obtenues peuvent se résumer de la façon suivante :

A) Lorsque des MCT sont incubés à des températures comprises entre 0 et 30 °C, on observe qu'une grande partie du K cellulaire est remplacée par du Na en quelques heures si la température appliquée est égale ou inférieure à 8 °C ; au-dessus de 8 °C, le MCT est donc capable de maintenir la composition en cations intracellulaires qu'il possède à 37 °C. L'addition d'ouabaine entraîne sur le MCT les mêmes effets qu'un refroidissement à 8 °C ou moins. Ces résultats suggèrent que, dans le MCT, la composante active du transport d'ions (Na-K-ATPase) est plus sensible à l'abaissement de température que les composantes passives. De fait, en présence d'amiloride, les cellules du MCT deviennent capables de maintenir jusqu'à un certain point leurs gradients ioniques même en-dessous de 8 °C, ce qui démontre que la pompe à sodium n'est pas complètement arrêtée à ces températures.

B) Lorsque des MAL sont soumis aux mêmes conditions expérimentales, les résultats sont différents, au moins pour les basses températures : même après une nuit à 0-4 °C, le contenu cationique des MAL reste inchangé par rapport à celui mesuré aux températures physiologiques ! ( $\text{Na}^+$ , 16mEq et  $\text{K}^+$ , 100mEq par litre de volume cellulaire). Aux très basses températures, même l'addition d'ouabaine ne permet pas l'inversion des gradients ioniques, probablement parce que chez le rat l'inhibition de l'enzyme par l'ouabaine n'est jamais complète. Par contre, l'omission complète de potassium dans le milieu d'incubation entraîne (à toute température) le remplacement de tout le potassium cellulaire par du sodium. Si, sur des tubules ainsi déplétés de leur potassium et maintenus à 0 °C, on rétablit une concentration de  $\text{K}^+$  normale dans le milieu (5mEq/l) on observe qu'en une heure environ, ces cellules sont capables de rétablir à 0 °C des gradients ioniques complètement normaux ! L'addition d'ouabaine empêche cette restauration. Ces expériences démontrent qu'à la différence du MCT, les très basses températures inhibent dans le MAL les composantes passives des flux ioniques transmembranaires proportionnellement autant (ou davantage) que leur composante active (Na-K-ATPase).

D'autre part, à la température de 30 °C, on peut abaisser la concentration de potassium dans le milieu jusqu'à 1 mEq/l sans que la concentration cellulaire des cations soit affectée dans le cas du MAL, tandis que la valeur critique correspondante est de 2.5 mEq/l dans le cas du MCT.

Ces résultats suggèrent que la composition cationique des cellules épithéliales tubulaires est assujettie à des mécanismes régulateurs précis et efficaces qui sont capables de la maintenir constante, même lorsque la température ou

la concentration de potassium extracellulaire varie dans un domaine étendu. La rédaction de ces résultats est en cours.

7) *Métabolisme énergétique des tubules isolés en survie in vitro* (A. HUSCITHAREL et F. MOREL)

Les travaux effectués ces deux dernières années sur des fragments microdisséqués de néphron de rat ont montré que, sous certaines conditions expérimentales bien établies, d'une part leur métabolisme oxydatif était directement relié à l'activité de la pompe Na-K-ATPase, d'autre part qu'ils étaient capables d'être maintenus en survie pendant plusieurs heures (de l'ordre de 2 à 4 heures); ces observations sont faites dans la branche large ascendante de l'anse de Henle et le canal collecteur (parties corticale et médullaire).

Ces résultats étant acquis, ils nous ouvraient donc des perspectives d'étude *in vitro* concernant notamment la régulation par les hormones corticoïdes du transport actif de sodium couplé au métabolisme oxydatif.

1) En ce qui concerne l'étude du canal collecteur cortical (CCT) chez des rats surrénalectomisés depuis 5 à 6 jours, nous avons observé une disparition quasi totale de la production de CO<sub>2</sub> « ouabaïne-sensible » dans ce segment. Ce résultat est en accord avec la baisse de Na-K-ATPase observée par DOUCET et al. Les essais d'induction *in vitro* par l'aldostérone (5.10<sup>-7</sup> M) du métabolisme oxydatif du CCT maintenu en survie pendant 4 heures sont demeurés jusqu'à présent négatifs dans les conditions expérimentales utilisées.

2) Au niveau de la partie médullaire de la branche large ascendante de l'anse de Henle (MAL), il a été possible de produire *in vitro* par la dexaméthasone (10<sup>-8</sup> M) une augmentation du métabolisme oxydatif de sodium qui est couplé au transport actif. Cet effet s'amorce au bout d'une heure d'incubation à 37 °C et devient statistiquement significatif au bout d'une heure et demie, pour se maintenir ensuite pendant deux heures et demie. On note malheureusement une grande variabilité dans l'aspect quantitatif de ces résultats, d'une expérience à l'autre, ainsi que dans leur décours temporel.

8) *Localisation des sites de liaison des benzodiazépines le long du néphron de rat* (D. BUTLEN)

Des travaux récents ont montré l'existence, dans les fractions membranaires de rein de mammifères, d'une très forte densité de sites fixant les benzodiazépines (environ 10 pmoles/mg protéine). Ces sites possèdent les propriétés pharmacologiques des « récepteurs de type périphérique » des benzodiazépines : ils lient avec une bonne affinité les benzodiazépines dépourvues d'action anxiolytique comme le Ro5-4864, et une drogue chimiquement non apparentée aux benzodiazépines et sans action pharmacologique connue *in vivo*, le PK 11.195, mais ne lient par les benzodiazépines à forte activité anxiolytique

comme le clonazepam. La présence de ces très nombreux « sites périphériques » n'a pu être mise en relation avec aucun test pharmacologique connu, ce qui pose le problème de connaître leur fonction biologique éventuelle. Une connaissance précise de la distribution des sites récepteurs aux benzodiazépines le long du néphron pourrait aider ultérieurement à rechercher un rôle éventuel joué par ces drogues dans les fonctions rénales.

Une forte densité de sites tubulaires fixant spécifiquement le [<sup>3</sup>H] PK 11.195 (1 à 2 fmoles/mm longueur) a été trouvée dans les parties corticales et médullaires de la branche large ascendante de l'anse de Henlé (MAL et CAL) et du canal collecteur (CCT et MCT) du néphron de rat, alors que ces sites n'ont pas pu être détectés dans les parties contournées et droites du tubule proximal. Sur les structures cibles, la liaison du [<sup>3</sup>H] PK 11.195 augmente linéairement en fonction de la longueur tubulaire ; elle est saturable en fonction du temps d'incubation et réversible après addition d'un excès de ligand non radioactif ; à l'équilibre de la fixation, la liaison est saturable en fonction de la dose de radioligand. La transformation des courbes dose-fixation dans le système de coordonnées de Hill donne des droites de pente supérieure à l'unité ( $n = 1,6$ ), ce qui suggère l'existence d'un léger phénomène de coopérativité positive dans le processus d'interaction du [<sup>3</sup>H] PK 11.195 avec les sites tubulaires de liaison. Le Ro5-4864 inhibe la liaison du [<sup>3</sup>H] PK 11.195 avec la même affinité que le PK 11-195 (environ 2 nM), alors que le clonazepam est sans action. Cet ordre de spécificité de reconnaissance des diverses benzodiazépines est le même que celui des sites présents sur les membranes rénales, ce qui indique que les sites tubulaires détectés avec le [<sup>3</sup>H] PK 11.195 peuvent représenter les récepteurs de type périphérique des benzodiazépines.

#### 9) *Etude du Système Kallibréine-Kinine à l'échelle des néphrons*

(J. MARCHETTI, S. ROSEAU)

Notre approche pour étudier le rôle du système kallibréine-kinine du rein a consisté à localiser, le long du néphron du lapin, les différents éléments du système. Dans un premier travail, nous avons montré que : 1) la kallibréine, enzyme qui permet la libération de kinines (molécules actives du système) à partir d'un substrat, le kininogène, est essentiellement localisée dans le tubule connecteur et 2) les mesures enzymatiques effectuées directement sur ce segment isolé devraient permettre d'étudier les variations de ce système dans différents états physiopathologiques (cf. publication sous presse). Cependant, l'activité intrarénale des kinines dépend non seulement des mécanismes qui les libèrent, mais aussi des activités susceptibles de les détruire. Nous avons donc, au cours de l'année écoulée, étudié la répartition des activités kininasiqes le long du néphron de lapin. La mesure des kininases tubulaires a été effectuée sur des segments, soit « perméabilisés » au moyen d'un choc osmotique et de congélations répétées, soit solubilisés avec du deoxycholate de sodium.

Une activité kininasique a été trouvée dans les glomérules, dans les tubules contournés proximaux (PCT), dans leur partie droite, la pars recta (PR), ainsi que dans le canal collecteur médullaire (MCT). Le traitement au deoxycholate de sodium augmente légèrement l'activité mesurée dans le PCT et la PR (20 % environ), par contre il diminue dramatiquement celle mesurée dans le MCT (plus de 60 %). Dans la perspective de préciser la nature des enzymes qui participent à l'activité kininasique des PCT, PR et MCT, nous avons recherché si le captopril, un inhibiteur de la kininase II (enzyme qui libère les 2 derniers acides aminés) diminue la capacité hydrolytique de ces segments. En présence de  $5.10^{-6}$  M de captopril, l'activité des PCT, PR et MCT est seulement réduite de 30 % environ, ce qui indique que plusieurs types d'enzymes contribuent à l'activité kininasique de ces segments. Par ailleurs, l'effet inhibiteur produit par le deoxycholate de sodium sur l'activité du MCT suggère que les enzymes présentes dans le PCT et la PR sont différentes de celles localisées dans le MCT.

Dans le rein, donc, plusieurs segments et plusieurs types d'enzymes participent au catabolisme des kinines. Les segments précoces du néphron pourraient être impliqués dans l'hydrolyse des kinines d'origine extra-rénales filtrées par le glomérule. Ainsi, seules seraient actives au niveau des segments distaux les kinines formées à l'intérieur du rein par la kallitréine du tubule connecteur ; et leur concentration serait contrôlée par les kininases présentes dans la partie terminale du néphron.

## II. ÉQUIPE DE BIOPHYSIQUE DES MEMBRANES

(C. GARY-BOBO, C. THOMAS, C. SAUTEREY, M. CASTAING)

Comme nous l'avons signalé ci-dessus, trois méthodes sont mises en œuvre au laboratoire pour étudier les propriétés de transport des « éthers couronne » et des « kryptates » insérés dans les membranes biologiques, à savoir :

- 1) les liposomes unilamellaires<sup>+</sup>,
- 2) les bicouches lipidiques planes (BLM),
- 3) les hématies humaines.

Une étude systématique des propriétés d'un « cryptand » hydrophobe des cations alcalins, le « 222 C<sub>10</sub> » (synthétisé par J.M. LEHN et collaborateurs) a été entreprise à l'aide de ces 3 méthodes. Les résultats obtenus confirment dans l'ensemble sur bicouches artificielles de phospholipides (méthodes 1) et 2)), ainsi que sur les hématies (méthode 3)) les résultats antérieurement décrits sur des systèmes de phases. La sélectivité du 222 C<sub>10</sub> pour les cations alcalins est retrouvée. En fait, cet ionophore possède une affinité plus grande pour l'ion K<sup>+</sup> que pour l'ion Na<sup>+</sup> ; le rapport de sélectivité K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> est cependant

beaucoup moins grand que pour la valinomycine. De même, l'activité spécifique du  $222\text{C}_{10}$  en tant que transporteur est notablement plus basse que celle de la valinomycine.

Il est prévu d'étendre ces comparaisons en analysant le comportement d'autres « cryptands » de structure voisine de celle du  $222\text{C}_{10}$ .

#### PUBLICATIONS

M. MOREL, A. DOUCET, G. EL MERNISSI and A. HUS-CITHAREL, *Control of active transport of sodium by corticoid hormones in kidney : a biochemical study using isolated, single pieces of tubule* (Symposium on New Techniques in Endocrine Research, Londres, November 18, 1983, Abstract).

F. MOREL, 1. *Introduction à la méthode des indicateurs nucléaires en Biologie*, pp. 9-10 ; 2. *Les récepteurs des hormones et des médiateurs*, pp. 23-24, in : *La Radioactivité artificielle et les Sciences de la Vie*, Cinquantenaire de la découverte de la radioactivité artificielle, 1983).

J.I. SUDO and F. MOREL, *Na and K cell concentration in single pieces of collagenase treated rat kidney tubules incubated at various temperatures* (*Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 5, 246, C 407- C 414, 1984).

F. LE BOUFFANT, A. HUS-CITHAREL and F. MOREL, *Metabolic  $\text{CO}_2$  production by isolated single pieces of rat distal nephron segments* (*Pflügers Archiv*, 401, n° 4, 346-353, 1984).

D. CHABARDES, M. MONTEGUT, M. IMBERT-TEBOUL and F. MOREL, *Inhibition of  $\alpha_2$ -adrenergic agonists on AVP-induced cAMP accumulation in isolated collecting tubule of the rat kidney* (*Molecular and Cellular Endocr.*, 1984, in press).

M. IMBERT-TEBOUL, D. CHABARDES, A. CLIQUE, M. MONTEGUT and F. MOREL, *Ontogenesis of hormone-dependent adenylate-cyclase in isolated rat nephron segments* (*Am. J. Physiol., Renal Fluid Electrolyte Physiol.*, 6, 247, 1984, F 316-F 325).

G. EL MERNISSI and A. DOUCET, with the technical assistance of S. SIAUME, *Short-term effects of aldosterone on renal sodium transport and tubular Na-K-ATPase in the rat* (*Pflügers Archiv*, 399, 139-146, 1983).

G. EL MERNISSI and A. DOUCET, with the technical assistance of S. SIAUME, *Short-term effects of aldosterone and dexamethasone on Na-K-ATPase along the rabbit nephron* (*Pflügers Archiv*, 399, 147-151, 1983).

G. EL MERNISSI and A. DOUCET, *Stimulation of Na-K-ATPase in the renal collecting tubule by two diuretics : Furosemide and Amiloride (Am. J. Physiol., 1984, sous presse).*

G. EL MERNISSI and A. DOUCET, *Quantitation of <sup>3</sup>H-ouabain binding and turnover of Na-K-ATPase along the rabbit nephron (Am. J. Physiol., 247, F 158-F 167, 1984).*

D. BUTLEN, T. BARTH, B. CANTAU, G. GUILLON, S. JARD, M. LEBL, F. BRITNIK and K. JOST, *The structural requirements of oxytocin and vasopressin analogues for the activation of adenylate cyclase in the rat kidney medullary membrane system (Coll. Czech. Chem. Comm., 48, 3166-3176, 1983).*

T. BARTH, M. LEBL, K. JOST, B. CANTAU, D. BUTLEN, G. GUILLON and S. JARD, *Interactions of deamino-6-carba-oxytocin analogues in rat kidney and liver membrane systems (Peptides, 1982, Ed. K. Blaha, P. Malon, 1983, W. de Gruyter & Co., Berlin, N.Y., pp. 467-470).*

T. BARTH, B. CANTAU, D. BUTLEN, G. GUILLON, S. JARD, M. LEBL and K. JOST, *Oxytocin and vasopressin analogues capable of competition with vasopressin binding to rat liver membranes (Coll. Czech. Chem. Comm., 48, 1788-1795, 1983).*

D. BUTLEN, *Benzodiazepine receptors along the nephron : [<sup>3</sup>H]-PK 1119 S binding in Rat tubules (F.E.B.S. Letter, 169, 138-142, 1984).*

G. GUILLON, D. BUTLEN and R. RAJERISON, *Evidences for two molecular forms of solubilized vasopressin receptors in rat kidney membranes : regulation by guanyl nucleotides (Mol. Pharmacol., 1984, in press).*

G. GUILLON and D. BUTLEN, *Kinetic and physicochemical properties of V<sub>1</sub> and V<sub>2</sub> vasopressin receptors : relation to cyclic AMP dependent and calcium dependent activation processes, In : J. Dumont et J. Nunez Ed., Hormones and Cell Regulation, Vol. 8, pp. 69-85, Elsevier Publ., Amsterdam, 1984).*

J. MARCHETTI, M. IMBERT-TEBOUL, F. ALHENC-GELAS, J. ALLEGRI- J. MENARD and F. MOREL, *Kallikrein along the rabbit microdissected nephron : a micromethod for its measurement (Pflügers Archiv, 401, 27-33, 1984).*

C. THOMAS, C. SAUTEREY, M. CASTAING, C.M. GARY-BOBO, J.M. LEHN and P. PLUMERE, *Cation Permeability induced by two 15-O<sub>5</sub> Macrocyclic Polyether Carriers in phospholipidic large unilamellar vesicles (Biochem. Biophys. Res. Comm., 116, 981-987, 1983).*

M.M. TRINH, G. EL MERNISSI, M. IMBERT-TEBOUL, A. DOUCET, L. BANKIR and F. MOREL, *ADH-dependent modulation of enzyme activities*

*and epithelium volume in the medullary thick ascending limb (MTAL) of Brattleboro Rats with diabetes insipidus (DI)* (IXth International Congress of Nephrology, Los Angeles, June 11-16, Abstract, 436 A, 1984).

A. TAYLOR, F. MOREL, E.E. WINDHAGER and S.C. SCHULTZ, *Second Messengers and Epithelial Transport* (IXth International Congress of Nephrology, Los Angeles, June 11-16, Abstract, 19 A, 1984).

#### MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS SUR INVITATION

M. François MOREL et M<sup>me</sup> Martine IMBERT-TEBOUL ont participé au XXIX<sup>e</sup> Congrès de l'Union Internationale des Sciences Physiologiques (I.U.P.S.) à Sydney (28 août-2 septembre 1984), où ils ont été respectivement président et orateur invités d'un Symposium. M. MOREL a été invité par la Société anglaise d'Endocrinologie à faire un exposé le 18 novembre 1983 à Londres, dans le cadre d'une réunion intitulée « New Techniques in Endocrine Research ». En novembre, il a donné des conférences aux Universités de Rabat et de Fès dans le cadre de la coopération franco-marocaine ; il a fait, en avril 1984, une série d'exposés à Bucarest, à l'invitation de l'Institut de Biophysique de l'Académie de Médecine ; il a ensuite participé au 7<sup>e</sup> Symposium « Biochemical Aspect of Kidney Function » à Bratislava ; enfin, il a fait un exposé sur invitation dans un Symposium du 9<sup>e</sup> Congrès International de Néphrologie (Los Angeles, juin 1984). M. Alain DOUCET a été invité à présenter un exposé au Centre Hospitalier de Luxembourg en mars 1984 ; il a également présenté sur invitation un rapport aux Actualités Néphrologiques de Necker, en mai 1984.

#### DIPLOMES ET PROMOTIONS

M. G. EL MERNISSI et M<sup>me</sup> C. EBERSOLT ont tous deux passé leur thèse de Doctorat ès Sciences.

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

Les résultats des travaux publiés au cours de l'année se répartissent selon les deux thèmes de recherche du groupe.

## I. MÉCANISMES MOLECULAIRES ET CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA RÉGULATION DE LA SÉCRÉTION DE PROLACTINE EN CULTURE

Il a été établi antérieurement que le tripeptide hypothalamique TRH stimule de façon durable la synthèse de prolactine (PRL) et inhibe simultanément la synthèse d'hormone de croissance (GH) par les cellules de la lignée clonale GH3 qui ont la propriété de sécréter simultanément ces deux hormones. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation inverse de l'expression de deux gènes dérivés d'un gène ancestral commun ont été analysés par les techniques de génétique moléculaire, à l'aide de sondes ADN complémentaires spécifiques de chacun d'eux. Les résultats montrent que le TRH accroît de façon rapide mais transitoire la transcription du gène de la prolactine. Cet effet, déjà très significatif après 30 min de traitement ( $\times 1,7$ ), atteint un maximum en 5 heures, puis décroît pour atteindre le niveau de base après 20 heures de traitement. L'effet transcriptionnel est suivi d'un transfert très rapide des ARN néosynthétisés dans le cytoplasme où l'on retrouve sensiblement la même cinétique. Inversement, le TRH induit progressivement une inhibition durable de la transcription du gène de GH, en même temps que de la synthèse des ARN totaux. De plus, il agit au niveau post-transcriptionnel : il stabilise les ARN<sub>m</sub>-PRL cytoplasmiques, dont la demi-vie est significativement accrue, alors qu'il tend à accélérer la dégradation des ARN<sub>m</sub>-GH. Ce double mécanisme, transcriptionnel et post-transcriptionnel, contribue à l'accroissement prolongé de synthèse de PRL d'une part et à la diminution prolongée de la synthèse de GH d'autre part (LAVERRIERE et al., 1983).

Par ailleurs, les recherches se sont poursuivies sur le rôle des matrices extracellulaires dans le contrôle de la sécrétion de prolactine par des cellules cultivées en milieu chimiquement défini. Il avait été montré précédemment (BRUNET *et al.*, 1982) que les cellules GH3 ensemencées en absence de sérum s'attachent difficilement à leur support plastique et que deux approches permettaient de pallier ce défaut : l'addition au milieu d'une glycoprotéine sérique, la P fétuine, ou bien l'ensemencement des cellules sur une matrice extracellulaire naturelle produite par les cellules endothéliales de la cornée (E.M.). On avait alors pu constater que la sécrétion basale de prolactine, comme la réponse à deux facteurs physiologiques stimulant la sécrétion de prolactine (TRH et œstradiol 17  $\beta$ ) était modulée différemment dans chacune de ces deux conditions d'attachement. L'analyse de ces phénomènes s'est poursuivie. Chacun de ces deux supports affecte différemment la forme des cellules et leur cinétique d'attachement, la capacité de prolifération et la réponse sécrétoire aux stimulants physiologiques. En outre, on a montré que ces deux supports sont également efficaces pour cultiver des cellules antéhypophysaires normales en absence de sérum et qu'ils modulent la forme des cellules et la

réponse sécrétoire aux stimulants physiologiques, de façon similaire à ce qui est observé pour les cellules GH3. Ces faits suggèrent que les cellules anté-hypophysaires normales possèdent des propriétés de surface communes avec les cellules clonales GH3. En outre, ils révèlent une relation importante entre la forme des cellules et leur capacité de réponse à des stimulants physiologiques (BRUNET et al., 1983).

## II. DÉVELOPPEMENT DES NEURONES HYPOTHALAMIQUES

Les perfectionnements réalisés précédemment dans la composition d'un milieu chimiquement défini pour la culture de cellules hypothalamiques fœtales de souris ont conduit à plusieurs résultats importants relatifs au rôle d'une hormone thyroïdienne, la triiodothyronine, sur le développement de deux types de neurones hypothalamiques. La triiodothyronine exerce par elle-même un effet morphogénétique sur les neurones dopaminergiques : elle augmente significativement la surface des périkaryons, la longueur et l'arborisation des neurites. Ceci est corrélé avec une augmentation de la capacité de capture de la dopamine tritiée. Par contre, la triiodothyronine n'affecte pas le nombre des neurones (PUYMIRAT et al., 1983). En ce qui concerne les neurones à thyrolibérine (TRH), la triiodothyronine n'agit qu'en présence de corticostérone et d'acides gras polyinsaturés, pour augmenter fortement (de 2 % à 17 % du contenu) la libération de TRH en réponse à une dépolarisation chimique. Dans ces conditions, le contenu neuronal en TRH n'est pas modifié, ce qui suggère une localisation des effets hormonaux au niveau des terminaisons axonales (LOUDES et al., 1983). Parallèlement à ces travaux, des résultats originaux ont été acquis, concernant des propriétés plus générales des cultures en milieu défini de cellules hypothalamiques fœtales. La production d'IGF<sub>s</sub> (« insulin-like growth factors ») et de leurs protéines de liaison dans le milieu a été mise en évidence en collaboration avec le Groupe du D<sup>r</sup> BINOUX (BINOUX et al., 1983). Le rôle de la laminine, composant majeur de la membrane basale, sur l'attachement de neurones cultivés en absence de sérum, a été mis en évidence pour la première fois pour des neurones centraux. En outre, la laminine favorise considérablement l'extension neuritique, mais s'oppose à la migration neuronale au sein de la culture (FAIVRE-BAUMAN et al., 1984).

### LISTE DES PUBLICATIONS

C. LOUDES, A. FAIVRE-BAUMAN, A. BARRET, D. GROUSELLE, J. PUYMIRAT and A. TIXIER-VIDAL, *Release of immunoreactive TRH in serum free cultures of mouse hypothalamic cells. (Developm. Brain Res., 9, 231-234, 1983).*

J.M. BOURRE, A. FAIVRE-BAUMAN, O. DUMONT, A. NOUVELOT, C. LOUDES, J. PUYMIRAT and A. TIXIER-VIDAL, *Effect of polyunsaturated fatty acids on fetal mouse brain cells in culture in a chemically defined medium* (*J. Neurochem.*, 41, 1234-1242, 1983).

J. PUYMIRAT, A. BARRET, R. PICART, A. VIGNY, C. LOUDES, A. FAIVRE-BAUMAN and A. TIXIER-VIDAL, *Triiodothyronine enhances the morphological maturation of dopaminergic neurons from fetal mouse hypothalamus cultured in serum free medium* (*Neurosci.*, 10, 801-810, 1983).

J.N. LAVERRIERE, A. MORIN, A. TIXIER-VIDAL, A.T. TRUONG, D. GOURDJI and J.A. MARTIAL, *Inverse control of prolactin and growth hormone gene expression : effect of thyroliberin on transcription and RNA stabilization* (*The E.M.B.O. J.*, 2, 1493-1499, 1983).

A. TIXIER-VIDAL, N. BRUNET and D. GOURDJI, *Control of prolactin secretion and cell proliferation in tumor derived rat pituitary strains* (*In : « Prolactin and Prolactinomas », G. Tolis, C. Stefanis, T. Mountokalakis and F. Labrie eds., Raven Press, pp. 327-337, 1983*).

N. BRUNET, D. BARRITAU, D. GOURDJI and A. TIXIER-VIDAL, *Role of Cell-substratum interactions in the hormonal control of rat prolactin cells* (*In : « Hormonally Defined Media. A Tool in Cell Biology », G. Fisher and R.J. Wieser eds., Springer Verlag, pp. 132-142, 1983*).

D. GOURDJI, N. BRUNET, J.N. LAVERRIERE, F. REYL-DESMARS, M.J.M. LEWIN and A. TIXIER-VIDAL, *Sites de liaison des neuropeptides régulant la cellule à prolactine. Caractéristiques et régulation hormonale* (*In : « Régulations cellulaires multihormonales en neuroendocrinologie », A. Tixier-Vidal and Ph. Richard eds., Editions I.N.S.E.R.M., pp. 297-318, 1983*).

C. TOUGARD, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL, *Transport intracellulaire de la prolactine et compartiments membranaires du réticulum endoplasmique* (*In : « Régulations cellulaires multihormonales en neuroendocrinologie », A. Tixier-Vidal and Ph. Richard eds, Editions I.N.S.E.R.M., pp. 435-450, 1983*).

C. LOUDES, A. FAIVRE-BAUMAN and A. TIXIER-VIDAL, *Techniques for culture of hypothalamic neurons* (*In : « Methods in Enzymology », 103, pp. 313-334, 1983*).

M. BINOUX, P. HOSSENLOPP, C. LASSARE, A. BARRET, A. FAIVRE-BAUMAN, C. LOUDES and A. TIXIER-VIDAL, *Production of insulin-like growth factors (IGFs) and their binding proteins (IGF BPs) by the pituitary gland and the nervous tissue in culture* (*In : « Insulin-like growth factors, somatomedins », E.M. Spencer ed., pp. 571-576, 1983*).

A. FAIVRE-BAUMAN, J. PUYMIRAT, C. LOUDES, A. BARRET and A. TIXIER-VIDAL, *Laminin promotes attachment and neurite elongation of fetal hypo-*

*thalamic neurons grown in serum-free medium* (*Neurosci. Letters*, 44, 83-89, 1984).

A. TIXIER-VIDAL, *The contribution of tissue culture to Neuroendocrinology* (In : « Tissue Culture and RES », P. Rohlich and E. Bacsy eds., pp. 393-404, 1984).

#### CONGRÈS

Symposium international « Tissue Culture in Neurobiology », Saskatoon, Canada, juillet 1983.

3rd European Workshop on Pituitary Adenomas, Amsterdam, septembre 1983.

2nd International Congress on Hormone and Cancer, Monte Carlo, septembre 1983.

Table ronde « Hormone Responsive Cells in Culture », Cassis, septembre 1983.

7th European Neuroscience Congress, Hambourg, 1983.

7° Colloque du Cercle Français de Biologie Cellulaire, septembre 1983.

Symposium international C.N.R.S. « Neuropeptides. A critical evaluation of basic concepts », Montpellier, septembre 1983.

IXth E.M.B.O. Annual Symposium « Membrane Traffic in the Animal Cell », Heidelberg, septembre 1983.

13° Congrès annuel de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Rouen, septembre 1983.

Symposium international « Hormone Control of the Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis », Weizman Institute, Rehovot, Israël, octobre 1983.

Table ronde franco-israélienne : « Recognition and coupling mechanisms involved in neuroendocrine regulations », Weizman Institute, Rehovot, Israël, octobre 1983.

First Symposium of the European Neuroendocrine Association, Bâle, mars 1984.

Journée « Radioautographie », Cinquantenaire de la découverte de la Radio-activité artificielle », Paris, avril 1984.

27° Journées internationales d'Endocrinologie clinique « Prolactine 84 », Paris, mai 1984.

35° Réunion de « American Tissue Culture Association », Houston, juin 1984.

### THÈSES

Jack PUYMARAT a soutenu sa thèse de Médecine en septembre 1983 sur le sujet : « Dysfonctionnement thyroïdien et systèmes catécholaminergiques ».

Annie MORIN a soutenu sa thèse de Doctorat ès Sciences en décembre 1983 sur le sujet : « Mécanismes intracellulaires de la réponse prolactine à la thyrolibérine : synthèse et renouvellement de la prolactine et de ses ARN messagers ».

Séminaires sur : « Tendances actuelles en neuroendocrinologie » dans le cadre du cours de la Chaire de Neuropharmacologie (P<sup>r</sup> J. GLOWINSKI) : D. GOURDJI et J. PUYMIRAT.

En outre, des séminaires ont été donnés dans divers laboratoires en France et aux Etats-Unis.

### PARTICIPATION A L'ENSEIGNEMENT

Cours sur les Techniques d'Immunocytochimie, Institut Pasteur : C. TOUGARD.

Stage de Microscopie Electronique du S.E.T.A.R.-C.N.R.S. : C. TOUGARD.

Module de Cytophysiologie, Université de Paris-Sud Orsay : C. TOUGARD.

D.E.A. de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire : C. TOUGARD.

D.E.A. de Physiologie de la Reproduction : A. TIXIER-VIDAL.