

## Physiologie cellulaire

M. François MOREL, professeur

L'étude des mécanismes par lesquels diverses hormones sont susceptibles de contrôler le fonctionnement de leurs cellules-cible respectives a, comme on le sait, beaucoup progressé au cours des dernières années, en particulier en ce qui concerne les processus moléculaires de reconnaissance du signal hormonal, de sa transduction et de son amplification. En outre, au moins sur certains types cellulaires dont l'étude expérimentale est particulièrement favorable (comme la cellule hépatique par exemple), les modalités conduisant aux réponses biologiques — ou tout au moins certaines d'entre-elles — ont été élucidées à l'échelle moléculaire ; en d'autres termes, on connaît aujourd'hui la séquence complète des réactions par lesquelles une hormone est susceptible de contrôler l'activité d'enzymes clef qui commandent diverses chaînes métaboliques.

Dans le cas de cellules épithéliales comme celles des tubules du rein, nos connaissances ont progressé moins rapidement pour deux raisons principales : l'hétérogénéité cellulaire du tissu rénal, d'abord, a longtemps représenté un obstacle difficile à surmonter en l'absence de techniques de séparation permettant de travailler *in vitro* sur des préparations cellulaires homogènes. Les effets produits par les hormones sur ce type de cellules, ensuite, ne concernent plus — ou pas seulement — des effets métaboliques portant sur la régulation d'enzymes bien caractérisées, mais plutôt des réponses physiologiques affectant les fonctions de perméabilité et de transport de ces cellules, c'est-à-dire touchant les propriétés de leurs membranes. Or, les mécanismes moléculaires qui assurent ces propriétés membranaires ne sont reconnus que depuis peu. Le sujet du cours, cette année, a porté sur l'analyse des mécanismes cellulaires par lesquels diverses hormones pourraient contrôler les fonctions des cellules proximales du rein.

\*  
\*\*

On sait que le tubule proximal assure toute une série de fonctions physiologiques bien définies et essentielles qu'il convient de rappeler brièvement.

Soixante pour cent des solutés et de l'eau filtrés dans les glomérules sont réabsorbés par les tubules proximaux (PCT) sous forme d'une solution isoosmotique. Cette réabsorption est sélective cependant, en ce sens que certains solutés sont réabsorbés préférentiellement et quantitativement, comme le glucose et les acides aminés. D'autres sont réabsorbés en quantités relatives variables selon les conditions expérimentales, comme le phosphate et le bicarbonate par exemple et leur transport est donc assujéti à des régulations dans lesquelles interviennent des hormones. On sait depuis longtemps, en effet, que l'hormone parathyroïdienne (PTH) et les corticoïdes surrénaliens modifient respectivement l'excrétion des phosphates et les mécanismes d'acidification de l'urine par le rein en contrôlant la réabsorption du phosphate et du bicarbonate par les tubules proximaux. Avant de discuter les mécanismes par lesquels ces effets hormonaux sont produits, il convient de rappeler comment fonctionnent ces cellules, puis de décrire les méthodes qui permettent aujourd'hui d'analyser les propriétés respectives de leurs membranes lumineales et basolatérales.

\*

\*\*

La polarité fonctionnelle des cellules épithéliales résulte de la ségrégation de propriétés différentes dans leurs membranes apicale (au contact du fluide tubulaire) et basolatérale (au contact du milieu intérieur). Dans les cellules proximales, comme dans toutes les cellules épithéliales, le couplage entre métabolisme énergétique et transport actif des solutés est assuré par une enzyme clef localisée dans les membranes basolatérales exclusivement, la Na-K-ATPase qui, comme on le sait, utilise l'énergie chimique de la liaison  $\gamma$ -phosphate de l'ATP pour assurer le transport transmembranaire de 3 ions sodium hors de la cellule contre 2 ions potassium qui entrent dans la cellule. Ainsi sont réalisés et entretenus entre milieux intra- et extra-cellulaire des gradients ioniques importants et inverses pour ces deux cations alcalins. De plus, en raison de la stoechiométrie de 3 Na pour 2 K qui la caractérise, la pompe cationique est rhéogénique et confère à la membrane cellulaire sa polarité électrique (60 à 70 mV dans le cas des cellules proximales). Les jonctions intercellulaires sont hautement perméables aux ions sodium et (à un moindre degré) aux ions chlorure dans les tubules proximaux, de sorte que la conductance électrique de la voie paracellulaire est élevée dans ce segment tubulaire, ce qui explique que la différence de potentiel transépithéliale y soit toujours très basse (de l'ordre de 1 à 2 mV). En conséquence de ce « shunt paracellulaire » de faible résistance, la différence de potentiel électrochimique engendrée pour les ions sodium par la Na-K-ATPase à travers la membrane basale se répercute intégralement au niveau de la membrane lumineale. C'est ce gradient de sodium qui, au niveau luminal, fournit l'énergie requise pour le transport spécifique et sélectif

des solutés réabsorbés par les cellules proximales. On sait en effet que différents systèmes de cotransport et de contre-transport assurent, dans cette membrane, le couplage obligé du flux d'ions sodium (le long de leur gradient électrochimique) avec le flux de divers solutés organiques ou inorganiques. Il existe ainsi des systèmes de cotransport Na-glucose, Na-acides aminés, Na-acides organiques, etc., chacun caractérisé par la sélectivité des substrats transportés, une capacité de transport maximal ( $V_{\max}$ ), une affinité pour les différents ligands impliqués et une stoechiométrie définie. Lorsque le transport est électroneutre (c'est le cas, par exemple, du transport de phosphate qui implique une stoechiométrie de  $2 \text{ Na}^+ - 1 \text{ PO}_4 \text{ H}_2^-$ ) l'accumulation intracellulaire du substrat transporté est énérgisée par le gradient chimique de sodium à travers la membrane. Lorsque le transport est électrogénique (c'est le cas, par exemple, du transport de glucose qui implique  $1 \text{ Na}^+ - 1 \text{ glucose}$ ), l'accumulation intracellulaire de glucose est énérgisée par le gradient électrochimique de sodium à travers la membrane. On voit donc que la présence de systèmes de transport saturables et spécifiques localisés dans la bordure en brosse des cellules proximales explique la sélectivité de réabsorption caractéristique de ce segment du néphron. On voit encore que l'efficacité de ces processus de réabsorption résulte d'un mécanisme d'énérgisation commun, à savoir leur couplage par cotransport avec des ions sodium, dont le gradient électrochimique à travers la membrane apicale est assuré par l'activité de la Na-K-ATPase basolatérale.

\*  
\*\*

Le cas particulier de la réabsorption du bicarbonate par le tubule proximal a été particulièrement discuté au cours, puisque cette réabsorption est assujettie à un contrôle exercé par différentes hormones. La majeure partie du bicarbonate filtré (80 à 90 pour cent) est normalement réabsorbée par ce segment des néphrons, alors que 60 pour cent seulement de l'eau et du sodium filtrés sont réabsorbés. C'est dire que la concentration de  $\text{HCO}_3^-$  dans le fluide tubulaire s'abaisse le long du tubule proximal, passant, dans les conditions normales, de 25 à 30 mEq/l à l'entrée du segment à 6 à 8 mEq/l à la fin du segment. On sait que les ions bicarbonate ne sont pas réabsorbés comme tels, mais qu'ils sont décomposés dans le fluide tubulaire par suite d'un mécanisme d'acidification par sécrétion tubulaire d'ions hydrogène. Il existe en effet dans la membrane luminale un système d'échange électroneutre  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  qui permet la sortie de protons contre leur gradient de concentration par couplage avec l'entrée de sodium dans la cellule. Ce système est spécifiquement bloqué par l'amiloride et sa stoechiométrie est de 1 pour 1. On sait que l'échangeur comporte un site de liaison externe pour les protons, dont le pK est de l'ordre de 7.3 - 7.5, correspondant probablement à un site imidazole d'un résidu histidine. Ce site serait

capable de fixer compétitivement différents cations monovalents selon un ordre d'affinité décroissant :  $H^+ \gg Li^+ > NH_4^+ = Na^+$ . Le fonctionnement de l'échangeur est symétrique et réversible. En outre, du côté interne (intracellulaire), existe un site régulateur sensible au pH, qui introduit une asymétrie dans le fonctionnement de l'échangeur. Lorsque le pH intracellulaire s'abaisse, ce site régulateur est activé, et la vitesse de fonctionnement de l'échangeur est accrue sans changement d'affinité du site de liaison pour les cations.

Le gradient maximal de concentration de protons que l'échangeur est théoriquement capable de générer à travers la membrane luminale est égal au gradient de concentration de sodium qui l'énergise, à savoir, environ 6 (si la concentration cellulaire de sodium vaut 25 mM), ce qui correspond à un  $\Delta$  pH de 0.8 unité, ou encore à un pH luminal de 6.5, si le pH intracellulaire est de 7.3. En pratique, cette valeur n'est jamais atteinte, puisque la concentration d'état stationnaire mesurée à la fin du tubule proximal pour le bicarbonate ne s'abaisse pas au-dessous de 6 à 8 mM, ce qui correspond à un pH luminal de 6.8 à 6.9. L'écart observé entre la valeur théorique et la valeur expérimentale traduit le fait que le rendement effectif du mécanisme d'acidification tubulaire est diminué par des flux dissipatifs le long des différents gradients ioniques, principalement par un flux passif de bicarbonate dirigé du plasma vers la lumière tubulaire le long de la voie intercellulaire. En fait, si l'échangeur apical  $Na^+/H^+$  constitue l'étape sélective du processus d'acidification proximale, il ne représente cependant que l'une des composantes d'une cascade de réactions cellulaires étroitement coordonnées, qui peut comporter différents facteurs limitants. En effet, la dissociation intraluminal du bicarbonate en  $CO_2$  et  $H_2O$  induite par la sécrétion de protons implique, pour se produire à une vitesse suffisante, l'action catalytique de l'anhydrase carbonique insérée dans le feuillet externe de la membrane apicale. Le  $CO_2$  qui pénètre par diffusion non ionique à travers la membrane redonne du bicarbonate et des protons dans la cellule (sous l'action de l'anhydrase carbonique cytoplasmique). Finalement, les ions bicarbonate cellulaires sortent à travers la membrane basolatérale par échange électroneutre contre des ions  $Cl^-$ . Le résultat net du processus cellulaire correspond, par molécule d'ATP hydrolysée, au transport transépithélial de 3 molécules de  $NaHCO_3$  et au recyclage à travers la membrane basolatérale des ions  $K^+$  et  $Cl^-$  correspondant à l'activité de la Na-K-ATPase et à l'échange  $Cl^-/HCO_3^-$ . L'efficacité du mécanisme d'acidification peut être inhibée ou même supprimée pharmacologiquement en agissant sur l'une ou l'autre des 5 étapes essentielles suivantes : 1) en réduisant le gradient luminal de sodium par inhibition de la Na-K-ATPase (ouabaïne) ; 2) en inhibant l'activité de l'échangeur  $Na^+/H^+$  (amiloride) ; 3) en ralentissant la vitesse d'hydratation du  $CO_2$  par inhibition de l'anhydrase carbonique (acétazolamide) ; 4) en bloquant l'échange chlore/bicarbonate baso-

latéral (DIDS) ; 5) en augmentant la conductance du shunt paracellulaire, ce qui augmente la rétrodiffusion dissipative du bicarbonate (baisse de la pression oncotique des protéines plasmatiques).

Il convient enfin de noter que le processus d'acidification proximale décrit ci-dessus représente l'un des processus majeurs à l'origine de la réabsorption isoosmotique proximale d'eau, et ceci par deux mécanismes, l'un direct, l'autre indirect. Le mécanisme direct correspond à la réabsorption d'eau liée à celle de  $\text{NaHCO}_3$ . A elle seule, cette réabsorption équivaut à environ 15 pour cent des solutés et de l'eau filtrés. Mais la réabsorption préférentielle de  $\text{HCO}_3^-$  dans ce processus a pour conséquence d'augmenter la concentration relative des ions chlorure dans le fluide tubulaire en dessus de l'équilibre de Donnan, et donc d'engendrer un potentiel de diffusion le long des jonctions intercellulaires hautement perméables aux ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$ . Il en résulte une réabsorption nette de  $\text{Na}^+$  (le long du gradient électrique ainsi créé) et de  $\text{Cl}^-$  (le long de son gradient chimique), même si le potentiel correspondant n'est que de l'ordre de 1 à 2 mV, face lumineuse électropositive (en effet la résistance ohmique de cette voie paracellulaire est très basse, de l'ordre de 10 ohm.cm<sup>-2</sup>). Cette réabsorption intercellulaire de NaCl — indirectement provoquée par la sécrétion de  $\text{H}^+$  — pourrait représenter jusqu'à 40 pour 100 de la réabsorption proximale de sel et d'eau. Toute situation dans laquelle l'acidification proximale est inhibée entraîne de fait une réduction importante de la réabsorption isoosmotique de fluide.

\*  
\*\*

On sait que la PTH inhibe le mécanisme d'acidification proximale. On sait encore que des récepteurs moléculaires à cette hormone sont présents dans les membranes cellulaires basolatérales et sont couplés à l'adenylate cyclase contenue dans ces mêmes membranes. D'ailleurs, l'AMP cyclique exogène inhibe l'acidification et la réabsorption volumique proximale au même titre que l'hormone elle-même. Mais le mécanisme exact par lequel le messenger intracellulaire inhibe le processus d'acidification n'est pas encore complètement élucidé. En fait, il se pourrait que l'hormone agisse à plusieurs niveaux simultanément, comme le suggère la phosphorylation accrue de nombreuses fractions protéiques (cytoplasmiques et membranaires) en réponse à l'action de l'hormone ou du cAMP. Les résultats expérimentaux en rapport avec ces différents niveaux d'action ont été longuement analysés au cours. Plusieurs effets de l'hormone méritent d'être pris en considération. A) l'hormone inhiberait l'anhydrase carbonique. Cet effet demande à être confirmé. B) l'hormone (et le cAMP) augmenteraient la perméabilité du shunt intercellulaire. Les arguments expérimentaux en faveur de ce mécanisme sont convaincants mais indirects. **Il reste à prouver que cet effet est bien la cause plutôt qu'une conséquence de l'inhibition du processus d'aci-**

dification. C) l'hormone (et le cAMP) inhiberaient directement l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . C'est l'action la mieux étayée expérimentalement, grâce à des études réalisées *in vitro* sur des vésicules préparées à partir des bordures en brosse des cellules proximales. Il a été observé de façon répétée que le flux amiloride-sensible de sodium mesuré sur de telles vésicules en présence d'un gradient de protons était augmenté deux fois environ dans les vésicules provenant d'animaux parathyroïdectomisés par rapport à celles des animaux témoins, alors que les flux dissipatifs de protons et de sodium n'étaient pas modifiés, ni le flux de cotransport  $\text{Na}^+$ -glucose. D) Enfin, il faut mentionner que la PTH, d'après des résultats tout récents, augmenterait l'activité de l'échangeur calcium/sodium localisé dans les membranes basolatérales des cellules. Cet effet serait produit par l'intermédiaire du cAMP et pourrait expliquer les effets de la PTH sur les flux de calcium observés *in vitro* sur des suspensions de cellules proximales. Une action de la PTH modifiant la concentration du calcium ionisé intracellulaire pourrait à son tour expliquer différentes actions proximales de cette hormone — et notamment son action sur la sécrétion de protons — si l'on postule que le calcium pourrait contrôler la contractilité de l'acto-myosine présente dans les microvillosités de la bordure en brosse. Une diminution de cette contractilité, en effet, pourrait compromettre l'efficacité des transports dépendant du sodium dans cette membrane en permettant la formation de « couches non mélangées ».

Les glucocorticoïdes surrénaliens sont également impliqués dans le contrôle du mécanisme d'acidification proximale. Leur action comporte également plusieurs composantes qui ont été discutées. Une composante métabolique concerne l'ammoniogénèse proximale, qui est stimulée par les glucocorticoïdes. L'ammoniac formé, en passant dans le fluide luminal (soit comme  $\text{NH}_3$  par diffusion non-ionique, soit comme ion  $\text{NH}_4^+$  par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ), augmente son pouvoir tampon, et par là même, améliore l'efficacité du mécanisme d'acidification proximale. Mais, en plus, il a été clairement établi sur des vésicules de bordure en brosse que les glucocorticoïdes agissent également sur l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  lui-même, dont ils stimulent l'activité. Là encore, l'effet est spécifique et ne touche pas les cotransports Na-glucose ou Na-acides aminés. Des études cinétiques détaillées démontrent que l'effet hormonal augmente le  $V_{\text{max}}$  de l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sans affecter ni la stoechiométrie de l'échange, ni son caractère électroneutre, ni son affinité pour les protons et le sodium, ni, enfin, son site régulateur. L'effet hormonal résulte donc soit d'une augmentation du nombre des unités de l'échangeur présentes dans la membrane, soit d'une augmentation de leur vitesse intrinsèque de fonctionnement.

L'acidose métabolique produit, sur l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , des effets simi-

lares à ceux des glucocorticoïdes. Des arguments expérimentaux (qui ont été détaillés) suggèrent que l'action induite *in vivo* par l'acidose métabolique sur l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  résulte en fait d'une production endogène accrue de glucocorticoïdes. Elle serait donc indirectement produite via ces hormones.

\*

\*\*

On voit donc, en conclusion, que nos connaissances relatives au mécanisme par lesquels la PTH et les glucocorticoïdes contrôlent le processus d'acidification de l'urine par les cellules proximales ont rapidement progressé au cours des toutes dernières années, grâce surtout à la mise en œuvre de la technique des vésicules de bordure en brosse, qui permet l'étude directe des propriétés de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  des membranes apicales et des effets que produisent sur lui ces deux types d'hormones. Mais il apparaît assuré que ces hormones produisent également d'autres effets sur ces mêmes cellules, effets qui contribuent de façon coordonnée à la régulation du processus d'acidification proximale. Une action pleiotrope exercée respectivement par la PTH (via la phosphorylation cAMP-dépendante de différents effecteurs protéiques) ou encore par les glucocorticoïdes (via la régulation au niveau nucléaire de la synthèse de différentes protéines régulatrices) contribue probablement à assurer un contrôle coordonné de cette fonction intégrée qui met en œuvre diverses composantes de l'activité des cellules proximales.

F. M.

Le cours a été complété par une série de 5 séminaires portant cette année sur les sujets suivants, en rapport avec le sujet du cours :

Le 30 novembre : D. BUTLEN : Etude de deux types de « récepteurs » rénaux, ceux des benzodiazepines et ceux du glucagon.

Le 7 décembre : M. BICHARA : Composante active du transport de protons par le tubule proximal.

Le 18 janvier : J.M. ELALOUF : Influence des hormones peptidiques sur les fonctions tubulaires rénales.

Le 25 janvier : M<sup>lle</sup> C. BAILLY : Effets distaux des hormones polypeptidiques.

Le 1<sup>er</sup> février : A. DOUCET : Action des hormones thyroïdiennes sur le rein.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

I. ÉQUIPE DE PHYSIOLOGIE RÉNALE

Comme nous l'avons indiqué dans notre précédent rapport, les travaux de recherche poursuivis dans le laboratoire de physiologie cellulaire sont regroupés autour d'une thématique unique, celle de l'étude des propriétés fonctionnelles des différents segments tubulaires qui constituent les néphrons du rein des mammifères. Notre analyse porte plus particulièrement sur la régulation hormonale de ces propriétés fonctionnelles et elle met en œuvre une série de microméthodes biochimiques adaptées aux dimensions des structures étudiées, à savoir, des segments uniques de néphron obtenus par microdissection de tissu rénal traité par la collagénase. Le recours à ces microtechniques est imposé par la nécessité de travailler sur des structures anatomiquement bien définies et de composition cellulaire homogène.

Certaines des méthodes mises en œuvre étudient des fonctions cellulaires sur des segments isolés en survie *in vitro* ; d'autres mesurent des activités enzymatiques sur des segments isolés perméabilisés et analysent les variations induites *in vivo* par des traitements appropriés appliqués aux animaux avant le prélèvement et la microdissection du rein.

Nous rappellerons brièvement la nature des problèmes abordés par ces différentes approches expérimentales, puis nous décrirons avec plus de détail les résultats obtenus pour certaines d'entre-elles.

a) *Les ATPases et leur régulation endocrinienne*

(A. DOUCET, C. BARLET et K. AÏT-MOHAMED)

En ce qui concerne la Na-K-ATPase des différents segments tubulaires, les recherches poursuivies ont concerné les effets produits par la thyroïdectomie (qui affecte l'enzyme de certains segments et non celle des autres) et les modalités de leur restauration par l'injection d'hormones thyroïdiennes. D'autre part, il a été observé que la sensibilité de la Na-K-ATPase à l'action inhibitrice de l'ouabaine est différente selon les segments du néphron chez le lapin, le  $K_i$  variant de près de deux ordres de grandeur entre le tubule collecteur et le tubule contourné proximal, alors que l'activité spécifique de l'enzyme ( $V_{max}$  par unité catalytique) et son activation par le potassium ( $K_A = 0.5$  mM) sont les mêmes dans ces différents segments.

D'autre part, la distribution le long des néphrons d'autres activités ATPasiques (ATPases anioniques, K-H-ATPases) impliquées dans le transport actif de protons est poursuivie.

b) *Activités peptidasiques spécifiques*

(J. MARCHETTI et S. ROSEAU)

La distribution le long des néphrons des enzymes liées à la génèse (kallikréine) et à la dégradation (kininases) de la bradykinine a été poursuivie, ainsi que l'étude des mécanismes régulateurs de ces activités (notamment le rôle des corticoïdes surrénaliens).

c) *Activité adénylate cyclasique et sa régulation hormonale*

(M. IMBERT-TEBOUL et S. SIAUME)

Cette microméthode, la première mise au point au laboratoire, continue d'être utilisée en routine, en association avec d'autres approches, pour analyser les effets induits dans différentes situations expérimentales (thyroïdectomie, surrénalectomie, etc.).

d) *Production endogène de cAMP et sa régulation*

(D. CHABARDÈS et M. MONTÉGUT)

On sait que les récepteurs de différentes hormones (prostaglandines, récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques) sont négativement couplés à l'adénylate cyclase, et que leur occupation entraîne une inhibition de la production de cAMP induite par d'autres hormones. Ces effets inhibiteurs sont difficiles à observer sur des fractions membranaires. Par contre, il a été observé, grâce à une microméthode de dosage radioimmunologique de l'AMP cyclique intracellulaire, que les catécholamines peuvent inhiber à plus de 80 pour cent, via des récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques, la réponse induite par la vasopressine sur des tubules collecteurs uniques en survie *in vitro*. Des recherches analogues poursuivies sur d'autres segments ont montré que le segment de dilution ne comporte pas de récepteurs adrénergiques  $\alpha_2$ . Des recherches analogues sont en cours pour analyser les effets des prostaglandines.

e) *Synthèse de prostaglandines in vitro et sa régulation*

(M. IMBERT-TEBOUL et S. SIAUME)

Une microméthode radioimmunologique de dosage de PGE<sub>2</sub> permet de mesurer la capacité de synthèse de prostaglandines par les cellules tubulaires épithéliales d'un segment tubulaire unique en survie *in vitro*. La distribution des enzymes conduisant de l'arachidonate aux PGE est analysée en recherchant la production de PGE<sub>2</sub> en présence du précurseur ajouté au milieu de survie. Les résultats sont positifs pour le tubule collecteur et l'analyse se poursuit pour les autres segments des néphrons. La même technique devrait ensuite permettre d'analyser dans quelles conditions — pour les segments capables de synthétiser la PGE<sub>2</sub> — il est possible d'induire la

production endogène d'arachidonate à partir des phospholipides qui en sont les précurseurs.

f) *Régulation de la concentration intracellulaire des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$*   
(R. RAJERISON et M. FAURE)

La microméthode utilisée permet, par photométrie de flamme, de mesurer la concentration intracellulaire des cations alcalins sur des tubules uniques maintenus en survie *in vitro* dans des conditions variées. Les effets des basses températures et/ou de la réduction de la concentration du potassium externe ont été analysés sur plusieurs segments, ce qui a permis de définir les conditions dans lesquelles il est possible de faire varier réversiblement le contenu relatif de sodium intracellulaire de moins de 10 à près de 100 pour 100 (et celui du potassium de plus de 90 à près de 0 pour 100). La méthode devrait permettre de montrer si les agents ou hormones qui stimulent (ou inhibent) le transport épithélial de sodium agissent sur la composante active du transport (Na-K-ATPase basale) ou sur sa composante passive (entrée apicale) : le contenu intracellulaire de sodium devrait varier en sens inverse selon que l'un ou l'autre de ces mécanismes est impliqué. L'adjonction de furosémide sur des segments larges ascendants isolés *in vitro* abaisse effectivement la concentration du sodium intracellulaire de 14 à 8 mM, ce qui est en accord avec l'action du diurétique sur l'entrée apicale de sodium. En abaissant la concentration du potassium externe de 5 à 1 mEq/l, on observe une diminution comparable du sodium cellulaire, ce qui démontre que l'entrée apicale de sodium est potassium dépendante (cotransport électroneutre 1 Na-1 K-2 Cl).

g) *Couplage du métabolisme oxydatif au transport d'ions*  
(A. HUS-CITTHAREL et F. MOREL)

Le métabolisme oxydatif est indirectement mesuré *in vitro* par la production de  $^{14}\text{CO}_2$  à partir d'un substrat uniformément marqué au  $^{14}\text{C}$  ajouté au milieu (U- $^{14}\text{C}$ -lactate ou U- $^{14}\text{C}$ -glucose). Dans les conditions normales, des segments uniques de branche large ascendante produisent 2 pmoles de  $\text{CO}_2$  par minute et par mm de longueur tubulaire à 30 °C. Le métabolisme oxydatif reste stable pendant plus de 2 heures. Le substrat ajouté (3 mM) n'est pas limitant, puisque l'addition d'un découplant (FCCP) augmente fortement la production de  $\text{CO}_2$ . Une fraction importante du métabolisme oxydatif est couplée au transport actif des ions, puisque l'addition d'ouabaine (qui bloque la pompe à sodium) ou de furosémide (qui bloque l'entrée apicale de Na sur ce segment) inhibe la production de  $\text{CO}_2$  de 50 à 60 pour 100. Le remplacement du chlorure du milieu par du sulfate en fait autant, ce qui démontre que l'entrée de Na est chlorure dépendante. En faisant varier la concentration de  $\text{Cl}^-$  externe, on montre que la pro-

duction de  $\text{CO}_2$  varie selon une courbe présentant une coopérativité positive ( $n$  de Hill = 2.12,  $K_A = 41$  mM), en accord avec l'existence d'un cotransport électroneutre 1 Na-1 K-2 Cl.

h) *Récepteurs hormonaux mesurés sur tubules isolés*

(D. BUTLEN)

Pour mettre en évidence des récepteurs hormonaux en étudiant la liaison spécifique d'hormone marquée sur des tubules isolés par microdissection, il est indispensable de disposer d'un ligand marqué à une très haute radioactivité spécifique, ce que permet seul un marquage par l'iode<sup>125</sup>I (1 000 Ci/mmmole ou davantage). La méthode a été utilisée pour rechercher la distribution des récepteurs du glucagon le long des néphrons du rat. De tels récepteurs ont été mis en évidence dans le segment de dilution et dans le tubule collecteur. L'affinité de la liaison est meilleure dans le segment de dilution ( $K_D = 2.4$  nM) que dans le tubule collecteur ( $K_D \approx 16$  nM). La liaison est spécifique et n'est déplacée que par le glucagon froid et, à un moindre degré, l'entérogucagon. La localisation obtenue correspond aux segments dans lesquels existe une adénylate cyclase sensible au glucagon. Le nombre de récepteurs mesuré est supérieur dans le segment de dilution (MAL et CAL : 16 et 27 attomoles par mm respectivement) à celui du tubule collecteur (CCT et MCT : 2 à 5 attomoles par mm respectivement). Ces capacités maximales de liaison spécifique sont proportionnelles aux  $V_{\max}$  d'activation de l'adénylate cyclase mesurés sur les mêmes segments, et les résultats indiquent que l'occupation d'un récepteur permet la formation de quelque 1 000 molécules de cAMP par minute à 30 °C (dans les conditions de mesure de l'activité de l'enzyme).

i) *Mesure de la concentration du calcium ionisé intracellulaire*

(A. FINN et F. MOREL)

On sait le rôle joué par le calcium intracellulaire dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, en particulier dans le contrôle de la perméabilité membranaire à certaines espèces ioniques (canaux conductifs calcium-dépendants). Avec A. Finn, en année sabbatique au laboratoire, nous avons essayé d'adapter la méthode du QUIN 2 à l'étude de la concentration du calcium intracellulaire et de ses variations sur des segments tubulaires uniques en survie *in vitro*. Ceci impliquait de recourir à la microscopie de fluorescence quantitative avec tous les problèmes d'étalonnage des signaux qui y sont associés. De nombreuses difficultés techniques et biologiques ont été rencontrées qu'il a fallu surmonter. Il est encore trop tôt pour affirmer qu'une microméthode quantitative précise et utilisable en routine pourra être mise au point, mais, au vu des progrès accomplis, cet enjeu important semble possible.

## II. ÉQUIPE DE BIOPHYSIQUE DES MEMBRANES

(C. GARY-BOBO, M. CASTAING, C. SAUTEREY et S. BUSCHLEN)

En collaboration avec J.-M. Lehn et son équipe, l'étude des propriétés de transport des cryptates insérés dans des liposomes unilamellaires a été poursuivie. Le comportement du 222 C10 a été analysé en détail, et notamment sa sélectivité vis-à-vis des ions sodium et potassium, par comparaison avec celui de la valinomycine. En présence d'un gradient de proton, le transport de cations par le 222 C10 est fortement accéléré lorsqu'un protonophore (FCCP) est ajouté au milieu. Les propriétés de transport d'autres cryptates sont en cours d'étude. M. Gary-Bobo ne pouvant plus assurer la direction de ce programme, il a été décidé, en accord avec les intéressés, de le suspendre si une équipe suffisamment étoffée ne peut pas être constituée à court terme. En tout état de cause, les expériences en cours seront achevées.

### PUBLICATIONS

A. DOUCET. *La Na-K-ATPase : données générales, rôle et régulation de la Na-K-ATPase rénale (Actualités Néphrologiques de l'Hôpital Necker.* Paris : Flammarion Médecine-Sciences, p. 1-67, 1984).

F. MOREL, D. CHABARDÈS. *Functional segmentation of the nephron. (In : The Kidney : Physiology and Pathology, Section II, edited by D.W. Seldin and G. Giebish. New York : Raven Press, ch. 23, p. 519-530, 1984).*

C. DE ROUFFIGNAC et M. IMBERT-TEBOUL. *Effects of antidiuretic hormone on renal reabsorption of electrolytes (In : Advances in Nephrology, edited by J.F. Bach, J. Crosnier, J.L. Funck-Brentano, J.P. Grünfeld, and M.H. Maxwell. Chicago : Year Book, vol. 13, p. 297-317, 1984).*

A. DOUCET. *Na-K-ATPase : General considerations, role and regulation in the Kidney (In : Advances in Nephrology, edited by J.F. Bach, J. Crosnier, J.L. Funck-Brentano, J.P. Grünfeld, and M.H. Maxwell. Chicago : Year Book, vol. 14, p. 87-159, 1985).*

K. BADDOURI, D. BUTLEN, M. IMBERT-TEBOUL, F. LE BOUFFANT, J. MARCETTI, D. CHABARDÈS et F. MOREL. *Plasma antidiuretic hormone levels and kidney responsiveness to vasopressin in the Jerboa, *Jaculus orientalis* (Gen. Comp. Endocrinol., 54, 203-215, 1984).*

D. BUTLEN, K. BADDOURI, R.M. RAJERISON, G. GUILLON, B. CANTAU et S. JARD. *Plasma antidiuretic hormone levels and liver vasopressin receptors*

in the Jerboa, *Jaculus orientalis*, and rat (*Gen. Comp. Endocrinol.*, 54, 216-229, 1984).

G. EL MERNISSI et A. DOUCET. *Specific activity of Na-K-ATPase after adrenalectomy and hormone replacement along the rabbit nephron* (*Pflügers Arch.*, 402, 258-263, 1984).

D. CHABARDÈS, M. IMBERT-TEBOUL et M. MONTEGUT. *Inhibition par les agonistes alpha-adrénergiques de l'action de la vasopressine sur le canal collecteur isolé* (*J. Physiol.*, Paris, 79, 2A, 1984).

G. EL MERNISSI et A. DOUCET. *Régulation de la Na-K-ATPase de segments de néphron par les corticostéroïdes surrénaliens* (*J. Physiol.*, Paris, 79, 3A, 1984).

J. MARCHETTI, S. ROSEAU, F. ALHENC-GELAS et F. MOREL. *Metabolism of lysyl-bradykinin (L-BK) by glomeruli and segments of microdissected rabbit nephron* (*Int. Congr. « Kinin 84 »*, Savannah (U.S.A.), 1984).

F. MOREL. *Coupling of receptors to adenylate cyclase and hormone action in kidney tubules* (*In : I.U.P.S. Symp. on Kidney and epithelial Physiol.* Jérusalem, 1984. Symp. on Hormone receptors and functions in the kidney).

C. BARLET et A. DOUCET. *Control of Na-K-ATPase along the rabbit nephron by thyroid hormones* (*Eur. Colloq. on renal physiology*, 5th, Frankfurt am Main, Abstr. n° 103, 1985).

D. BUTLEN et F. MOREL. *Distribution of glucagon receptors in the rat nephron* (*Eur. Colloq. on renal physiology*, 5th, Frankfurt am Main, Abstr. n° 234, 1985).

D. CHABARDÈS, M. MONTEGUT, M. IMBERT-TEBOUL et S. SIAUME. *cAMP accumulation in the cortical (CAL) and medullary (MAL) portions of the thick ascending limb* (*Eur. Colloq. on renal physiology*, 5th, Frankfurt am Main, Abstr. n° 235, 1985).

A. DOUCET. *Short-term control of the synthesis and specific activity of tubular Na-K-ATPase* (Invited paper at *Eur. Colloq. on renal physiology*, 5th, Frankfurt am Main, 1985).

F. MOREL. *The diluting segment of the kidney in mammals : Biochemical and functional characteristics* (*In : I.U.P.S. Int. Symp. Jubilee Congr. Hungar. Physiol. Soc.*, 50th, Budapest, 1985).

R.M. RAJERISON, M. FAURE et F. MOREL. *Electrolyte properties of isolated rat kidney tubules : Effects of temperature and diuretics* (*Eur. Colloq. on renal physiology*, 5th, Frankfurt am Main, Abstr. n° 53, 1985).

#### MISSIONS, CONFÉRENCES ET CONGRÈS SUR INVITATION

M. François MOREL a été invité à présider une séance et à faire un exposé à Jérusalem, dans le cadre du Congrès régional de l'I.U.P.S., en septembre 1984. Il a fait un exposé introductif au Colloque international sur « Les nouveaux systèmes natriurétiques endogènes », organisé à Seillac par l'I.N.S.E.R.M. du 11 au 15 novembre 1984. Avec A. DOUCET, il a effectué au Maroc une mission, du 28 octobre au 1<sup>er</sup> novembre 1984, pour participer à plusieurs jurys de thèse. A. DOUCET a fait sur invitation une conférence à l'Université de Montréal, en décembre 1984, puis il a participé, à Washington, au Congrès de l'A.S.N. J. MARCHETTI a été invitée à présenter une communication à Savannah (U.S.A.), dans le cadre d'un Colloque international sur les kinines. Différents membres du laboratoire ont présenté des communications au 5<sup>e</sup> Colloque Européen de Physiologie Rénale, à Frankfort, en juin 1985. A. DOUCET y a fait un exposé sur invitation. Plusieurs chercheurs du laboratoire ont présenté des séminaires sur invitation dans différents laboratoires français.

F. MOREL a été nommé membre du Comité National d'Evaluation des Universités.

A. DOUCET a assuré un enseignement de Physiologie rénale dans le cadre du Module d'Endocrinologie métabolique et fonctionnelle délivré par l'Université de Paris 6.

#### DIPLOMES ET PROMOTIONS

Danielle CHABARDÈS a été nommée Maître de Recherche au C.N.R.S.

M. V. HOMBURGER a passé une thèse de Docteur d'Etat ès Sciences. M. M. BEN ABDELKHALEK et M<sup>me</sup> S. BUSCHLEN ont passé chacun une thèse de 3<sup>e</sup> Cycle.

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

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

## I. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA SÉCRÉTION DE PROLACTINE

Les travaux parus au cours de l'année concernent essentiellement plusieurs aspects des mécanismes cellulaires impliqués dans le processus sécrétoire étudié dans deux modèles de cellules à prolactine en culture : les cellules de la lignée GH3 et les cellules antéhypophysaires normales de rat en culture primaire.

Une étude cinétique du renouvellement de la prolactine a été conduite par des expériences mettant en œuvre un marquage bref des protéines cellulaires suivi d'une chasse prolongée jusqu'à 24 h. Ces expériences ont eu un double objectif : 1° d'une part, comparer deux modèles cellulaires différant entre eux par leur capacité de stockage intracellulaire de la prolactine, qui est beaucoup plus élevée pour les cellules normales, riches en grains de sécrétion, que pour les cellules GH3, 2° d'autre part, analyser les effets sur le transit intracellulaire de la prolactine, d'un neuropeptide, la thyrolibérine (TRH) dont il a été précédemment montré qu'il stimule en quelques minutes la libération de la prolactine. Ces travaux, réalisés par Annie MORIN (1984), lui ont permis d'établir plusieurs conclusions importantes relatives à l'existence de compartiments intracellulaires de prolactine et aux modalités d'action du TRH sur ces compartiments. En effet, dans les deux systèmes cellulaires, la prolactine est distribuée dans plusieurs compartiments, au moins deux, qui diffèrent entre eux par leur temps de renouvellement ; en outre, les durées respectives de renouvellement (demi-vies) de chacun de ces deux compartiments sont nettement plus élevées dans les cellules normales (2 h 1/2 et 22 h) que dans les cellules GH3 (15 min et 3 h). Dans les deux systèmes, la prolactine récemment synthétisée est libérée préférentiellement dans les conditions basales, alors que l'exposition au TRH induit la libération d'un compartiment présynthétisé et donc stocké. Ces données sont en faveur de l'existence de plusieurs voies intracellulaires de prolactine, régulées séparément. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse des effets de la monensine. Cette drogue, dont on a montré précédemment qu'elle provoque l'accumulation de prolactine dans la zone golgienne, ne s'oppose pas à l'effet stimulant du TRH sur la libération d'un compartiment préformé, qui est donc vraisemblablement situé en aval du blocage golgien par la monensine. Une autre conclusion importante concerne la mise en évidence de l'existence dans les deux systèmes d'un compartiment intracellulaire de prolactine non mobilisable par le TRH et qui représente une proportion importante de la prolactine intracellulaire marquée, présente au temps 0 de la chasse : 80 % après 24 h de chasse. L'analyse par immunoréplique de ce matériel séquestré dans la cellule montre qu'il correspond à des formes moléculaires immunoréactives de poids moléculaire élevé (45 à 50 000 D au lieu de 23 000 pour la prolactine) qui sont

associées, dans les cellules normales seulement, à des formes légères (18 000-15 000 D) allant de pair avec une activité de dégradation non détectable dans les cellules GH3. Dans leur ensemble, les résultats de cette étude biochimique des compartiments de prolactine sont en très bon accord avec les données d'immunocytochimie ultrastructurale recueillies par C. TOUGARD sur les mêmes systèmes cellulaires.

Parallèlement à cette étude des compartiments intracellulaires de prolactine, les recherches sur les compartiments des membranes du reticulum endoplasmique se sont poursuivies à l'aide de nouvelles sondes immunologiques préparées par Daniel LOUVARD (Institut Pasteur, Paris). Claude TOUGARD avait précédemment (1983) étudié, par immunocytochimie ultrastructurale, la distribution d'un antigène golgien dans les conditions basales et stimulées de la sécrétion de prolactine. Cette année (TOUGARD et al., 1985), la mise en œuvre d'une nouvelle sonde immunologique dirigée contre un antigène (100 000 D) de la membrane lysosomale, apparenté immunologiquement à une pompe à protons (REGGIO et al., 1984), a permis d'analyser la voie centripète des mouvements membranaires, voie impliquée dans l'endocytose. Ceci a conduit à la mise en évidence dans les cellules à prolactine d'un compartiment prélysosomal correspondant à une première étape (15 min) de l'endocytose absorptive révélée à l'aide de la ferritine cationisée. Au contraire des lysomes, dont la membrane est également reconnue par l'anticorps, ce compartiment ne possède pas d'activité phosphatase acide. Il semble donc représenter un compartiment acidifié prélysosomal, récemment décrit dans d'autres systèmes et qui jouerait un rôle dans la dissociation des complexes « ligand-récepteur » au cours de leur endocytose. La distribution de cet antigène dans différentes conditions de stimulation de la sécrétion de prolactine est maintenant étudiée.

Dans le cadre de nos travaux sur les facteurs d'attachement des cellules à prolactine cultivées en absence de sérum, Claude TOUGARD s'est attachée à identifier par immunocytochimie en microscopie photonique et électronique quelques composants de la membrane basale. Elle a constaté une réaction positive intense pour la laminine dans les membranes basales des cordons glandulaires du tissu adénohypophysaire. En outre, une localisation intracellulaire de cette glycoprotéine a été observée dans les cellules glandulaires *in vivo*, de même qu'en culture primaire. Au microscope électronique, la réaction positive est observée dans des sites de synthèse (reticulum rugueux), de transit (citernes golgiennes) et de stockage (grains de sécrétion) (TOUGARD et al., 1985). Ces résultats ouvrent la voie à une étude du transport, de l'exportation et du rôle physiologique de la laminine en relation avec l'activité sécrétoire des cellules adénohypophysaires.

Nicole DE CARVALHO a poursuivi ses travaux sur l'analyse du rôle de l'œstradiol 17  $\beta$  dans le contrôle de la prolifération des cellules GH3 et

de la sécrétion basale et stimulée de prolactine (BRUNET et al., 1985). Mettant à profit les conditions de culture en milieu chimiquement défini qu'elle a précédemment établies (1981), elle a montré que l'œstradiol testé dans une très large gamme de doses n'est pas mitogène pour les cellules GH3. La dépendance œstrogénique de la croissance des cellules GH3 *in vivo* impliquerait donc un mécanisme indirect, comme cela a été suggéré par d'autres auteurs. Par contre, dans les mêmes conditions, l'œstradiol 17  $\beta$  stimule la production de prolactine ; cet effet exige un prétraitement d'une durée supérieure à 24 h, il est dépendant de la dose (ED 50 :  $5 \times 10^{-10}$  M) et spécifique de l'œstradiol. Enfin, l'effet stimulant de l'œstradiol sur la production de prolactine est additif à celui du TRH. Ceci contraste avec l'interaction fortement positive exercée par l'œstradiol sur l'effet stimulant du TRH sur la libération de prolactine préformée, précédemment constatée au laboratoire. Ce résultat original suggère que les effets stimulants respectifs du TRH et de l'œstradiol sur la transcription du gène de la prolactine sont dirigés par des mécanismes indépendants.

Parallèlement aux progrès résumés ci-dessus dans l'analyse des mécanismes cellulaires de la sécrétion de prolactine, les recherches sur l'analyse des mécanismes transcriptionnels impliqués dans le contrôle de la sécrétion de prolactine se sont poursuivies dans plusieurs directions. Une étude de la méthylation et des effets de la déméthylation du gène de la prolactine est en cours de publication.

## II. DÉVELOPPEMENT DES NEURONES HYPOTHALAMIQUES

Les travaux se sont poursuivis sur le développement des neurones hypothalamiques fœtaux de souris cultivés dans des conditions chimiquement définies, précédemment établies et permettant l'expression de fonctions neuronales différenciées, telles que neurones dopaminergiques et neurones peptidergiques à thyrolibérine. Les mécanismes de l'effet morphogénétique exercé par la triiodothyronine sur les neurones dopaminergiques sont en cours d'analyse par des approches convergentes (J. PUYMIRAT). La validité du modèle pour une étude de la biosynthèse de la thyrolibérine a été établie et les recherches se poursuivent dans ce sens (A. FAIVRE-BAUMAN et C. LOUDES). Enfin, la recherche de signaux chimiques capables d'induire l'expression d'un phénotype neuronal par la lignée primitive F7 (lignée hypothalamique transformée par le SV 40), développée par F. DE VITRY, est en progrès.

Les travaux publiés cette année concernent soit des revues sur invitation, soit des aspects ponctuels, soit des données préliminaires faisant l'objet de développements en cours. Parmi les aspects ponctuels, je citerai la mise en

évidence chez la souris d'un effet marqué de l'hypothyroïdisme prénatal et périnatal (traitement par le propylthiouracile appliqué à partir du 16<sup>e</sup> jour de gestation jusqu'au 20<sup>e</sup> jour post-natal) sur le développement des neurones dopaminergiques hypothalamiques : chute de 37 % du contenu en dopamine associé à une chute de 50 % du contenu en DOPAC, le métabolite de la dopamine, suggérant ainsi une diminution du métabolisme de la dopamine (PUYMIRAT et al., 1984). Ces données apportent une validation physiologique aux études conduites en culture sur les neurones dopaminergiques. Par ailleurs, l'évolution du contenu en TRH de l'hypothalamus et du cerveau extra-hypothalamique au cours du développement prénatal et post-natal du rat (du 12<sup>e</sup> jour intra-utérin au 47<sup>e</sup> jour post-natal) a été déterminée par dosage radioimmunologique (NEMESKERI et al., 1985). Les résultats montrent, comme nous l'avons trouvé précédemment chez la souris, une apparition très précoce du TRH qui est déjà détectable au 12<sup>e</sup> jour fœtal, puis une croissance très rapide du contenu jusqu'au 15<sup>e</sup> jour de gestation, un peu moins rapide ensuite. De plus, le contenu moyen en TRH par hypothalamus est constamment plus élevé (de 2 à 4 fois) que pour le reste du cerveau. Enfin, aucune différence en fonction du sexe n'a été observée pendant la période post-natale.

Les résultats préliminaires publiés concernent la mise en évidence d'une synaptogénèse complète dans des cultures de cellules hypothalamiques entretenues en milieu chimiquement défini, convenablement supplémenté dans des conditions précédemment établies et qui permettent la libération de thyrolibérine dans le milieu en réponse à une brève dépolarisation chimique (FAIVRE-BAUMAN et al., 1984 ; TIXIER-VIDAL et al., 1984). Les potentialités multiples ainsi offertes par ces cultures pour l'analyse des facteurs épigénétiques contrôlant la synaptogénèse et la plasticité synaptique sont activement exploitées.

#### LISTE DES PUBLICATIONS

A. FAIVRE-BAUMAN, J. PUYMIRAT, C. LOUDES and A. TIXIER-VIDAL, *Differentiated mouse fetal hypothalamic cells in serum-free medium* (In : « Cell Culture Methods for Molecular and Cell Biology », volume 4, Methods for Serum-Free Culture of Neuronal and Lymphoid Cells, D.W. Barnes, S.A. Sirbasku and G.H. Sato eds, Alan R. Liss Inc N.Y., pp. 37-56, 1984).

A. TIXIER-VIDAL and C. TOUGARD, *Recent progress in cell biology of secretory process in anterior pituitary cells* (From : « Hormonal Control of the Hypothalamo-Pituitary Gonadal Axis », Kenneth W. McKerns ed., Plenum Publishing Corporation, pp. 169-180, 1984).

A. MORIN, E. ROSENBAUM and A. TIXIER-VIDAL, *Effects of thyrotropin-releasing hormone on prolactin compartments in clonal rat pituitary tumor cells* (*Endocrinology*, 115, 2271-2277, 1984).

A. MORIN, E. ROSENBAUM and A. TIXIER-VIDAL, *Effects of thyrotropin-releasing hormone on prolactin compartments in normal rat pituitary cells in primary culture* (*Endocrinology*, 115, 2278-2284, 1984).

F. DE VITRY, *Search for stem cells and their characteristics in the mouse hypothalamus* (From : « The Role of Cell Interactions in Early Neurogenesis », A.M. Duprat, A.C. Kato and M. Weber, eds, Plenum Publishing Corporation, pp. 123-129, 1984).

A. TIXIER-VIDAL, *Contributions of in vitro systems to the analysis of perinatal neuroendocrine mechanisms* (In : « Fetal Neuroendocrinology », F. Ellendorff, P.D. Gluckman and N. Parvizi, eds, Perinatology Press, pp. 91-106, 1984).

J. PUYMIRAT, A. BARRET, G. BLANC, A. FAIVRE-BAUMAN, C. LOUDES and A. TIXIER-VIDAL, *Effects of thyroid hormones on the development of mouse hypothalamic dopaminergic neurons* (In : « Fetal Neuroendocrinology », F. Ellendorff, P.D. Gluckman and N. Pavizi, eds, Perinatology Press, pp. 121-127, 1984).

N. DE CARVALHO, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL, *17  $\beta$ -estradiol regulates prolactin secretion but not cell proliferation of GH3/B6 cells in chemically defined medium* (*Mol. and Cell. Endocrinol.*, 39, 49-60, 1985).

C. TOUGARD, D. LOUVARD, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL, *Antibodies against a lysosomal membrane antigen recognize a prelysosomal compartment involved in the endocytic pathway in cultured prolactin cell* (*The J. of Cell Biol.*, 100, 786-793, 1985).

C. TOUGARD, D. LOUVARD, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL, *Immunocytochemical localization of laminin in rat anterior pituitary cells in vivo and in vitro* (*In Vitro, Cellular and Developmental Biology*, 21, 57-61, 1985).

A. NEMESKERI, D. GROUSELLE, A. FAIVRE-BAUMAN and A. TIXIER-VIDAL, *Developmental changes of thyroliberin (TRH) in the rat brain* (*Neuroscience Letters*, 53, 279-284, 1985).

#### CONGRÈS

IV International Congress on Prolactin, Charlottesville, Virginia, 27-29 juin 1984.

Congrès International d'Endocrinologie, Québec, Canada, juillet 1984.

15° Congrès de Psychoneuroendocrinologie, Vienne, Autriche, 16-17 juillet 1984.

E.M.B.O. Advanced Lecture, Course « Molecular Genetics of Mammalian Development », Pavie, Italie, 3-15 septembre 1984.

International Forum of Peptides, le Cap d'Agde, 24-28 septembre 1984.

2° Colloque annuel de la Société de Biologie Cellulaire de France, Paris, 17-19 septembre 1984.

XIV° Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Besançon, 27-28 septembre 1984.

Congrès « Fetal Neuroendocrinology », Mariensee, R.F.A., 4-8 novembre 1984.

International Symposium on The Pituitary Gland. Tokyo, novembre 1984.

IX° Conférence en Neurobiologie, Gif-sur-Yvette, 29-30 novembre 1984.

F.E.B.S. Winter Course on Neuropeptides, Maria Alm, Autriche, 9-18 mars 1985.

30° Ohlo Conference on Dementia, Eilat, Israël, 24-27 mars 1985.

Colloque d'Animation de la Recherche 1984-1985, I.N.S.E.R.M., « Génétique Moléculaire et Pathologie », Bligny-sur-Ouche, Côte-d'Or, 24-26 avril 1985.

I.N.S.E.R.M. Symposium on Regulatory Peptides, Gouvieux-Chantilly, 9-11 mai 1985.

25° Colloque annuel de la Société Française de Microscopie Electronique, Strasbourg, 28-31 mai 1985.

Symposium Sanofi-Recherche, Toulouse Labège, 29-30 mai 1985.

Symposium de la Société de Biologie Cellulaire de France : « Translocation des Protéines », Compiègne, 11-12 juin 1985.

6° minicolloque I.N.S.E.R.M. « Génétique Moléculaire et Pathologie du Système Nerveux Central », Bligny-sur-Ouche, Côte-d'Or, 13-16 juin 1985.

2nd International Symposium on Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Related Peptides, le Cap d'Agde, 18-22 juin 1985.

COURS ET SÉMINAIRES

Réunion du C.A.N.I.F., Gif-sur-Yvette, septembre 1984.

Conférence à l'Université de Liège, Enseignement post-gradué de Neurologie, octobre 1984.

Cours pour le European Training Program in Brain and Behaviour Research, Centre de Neurochimie, Strasbourg, novembre 1984.

Séminaires au Département d'Endocrinologie de la Faculté de Médecine de Kyoto et au Département d'Anatomie de la Faculté de Médecine de Tokushima, Japon, novembre 1984.

Séminaire à Ulm, R.F.A., chez le Prof. PILGRIM, février 1985.

Séminaire sur les démences au Centre Paul Broca, Paris, mars 1985.

Séminaire dans l'Unité de J. NUNEZ, Créteil, mai 1985.

PARTICIPATION A L'ENSEIGNEMENT

D.E.R.B.H. de Neurochimie Expérimentale et Clinique, Paris, décembre 1984, F. DE VITRY.

Stage de Microscopie Electronique du C.N.R.S. - Formation, janvier 1985, C. TOUGARD.

Cours à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Ecole de Médecine, Paris, 12 février 1985, D. GOURDI.

Module de Cytophysiologie, Université de Paris-Sud, Orsay, avril 1985, C. TOUGARD.

D.E.A. de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, mai 1985, A. MORIN.

D.E.A. de Physiologie de la Reproduction, Paris VI, mai 1985, A. TIXIER-VIDAL.

Cours sur les techniques d'immunocytochimie, Institut Pasteur, juin 1985, C. TOUGARD.

Préparation des réunions du Cercle Amical des Neuroendocrinologistes de l'Île-de-France (C.A.N.I.F.), D. GOURDJI et J. PUYMIRAT.

THÈSE

Nicole DE CARVALHO-BRUNET a soutenu sa thèse de Doctorat ès Sciences le 19 avril 1985 sur le sujet : « Rôle de l'environnement extra-cellulaire dans le contrôle de l'activité des cellules à prolactine ».