

## Physiologie cellulaire

M. François MOREL, professeur

L'enseignement de physiologie cellulaire a comporté, cette année, des séminaires, et des cours en nombre réduit. Le sujet de ces derniers a prolongé ou plutôt approfondi un problème qui avait été abordé mais non complètement traité dans le cours de l'an dernier, faute de données expérimentales disponibles à ce moment-là. Il s'agit, en l'occurrence, d'une des étapes cellulaires impliquées dans le mécanisme par lequel le tube proximal du rein contribue à l'acidification de l'urine. On rappellera que ce mécanisme comporte une étape localisée dans la membrane luminale des cellules épithéliales et qui consiste en une excrétion de protons par l'intermédiaire d'un échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  électroneutre localisé dans cette membrane. Le potentiel électrochimique existant pour les ions  $\text{Na}^+$  à travers la membrane énergisé la sortie de protons ; l'acidification du fluide tubulaire qui en résulte entraîne la dissociation du bicarbonate et la diffusion de  $\text{CO}_2$  dans les cellules, où des ions bicarbonate se reforment. A l'état stationnaire de fonctionnement de ce mécanisme, la membrane basale des cellules doit être traversée par des flux nets sortant d'ions  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{Na}^+$  qui compensent les flux nets apicaux de  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{CO}_2$ . On pensait légitimement que le flux de sodium était assuré par transport actif via la Na-K-ATPase membranaire et que la sortie de bicarbonate devait résulter d'un échange électroneutre  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ , les ions  $\text{Cl}^-$  impliqués dans cet échange ainsi que les ions  $\text{K}^+$  impliqués dans le fonctionnement de la pompe à sodium ressortant grâce à un cotransport électroneutre de KCl.

Divers auteurs, mais surtout le groupe de Frömter et collaborateurs à Francfort ont établi tout récemment que ce mécanisme est incorrect. En effet, des mesures électrophysiologiques appropriées ont permis de montrer chez le rat que la membrane périlitubulaire des cellules proximales n'a pas la conductance élevée pour les ions  $\text{Cl}^-$  que l'on attendait, mais au contraire une conductance élevée pour les ions  $\text{HCO}_3^-$  (ou  $\text{OH}^-$ ).

Ces auteurs ont montré ensuite que la sortie de  $\text{HCO}_3^-$  de la cellule est électrogénique et, en outre, est associée à la sortie nette simultanée d'ions sodium. Enfin, une série d'arguments expérimentaux complémentaires qui ont

été analysés et discutés en détail au cours ont permis à Frömter et coll. de démontrer la présence dans la membrane de ces cellules d'un système de cotransport électrogénique  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  ayant probablement une stoechiométrie de 3  $\text{HCO}_3^-$  pour 1  $\text{Na}^+$  cotransporté.

La mise en évidence d'un tel mécanisme de transport ionique couplé  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  revêt un grand intérêt physiologique à deux égards.

Du point de vue énergétique d'abord, on voit que la sortie *électrogénique* de bicarbonate s'effectue, à travers la membrane, dans le sens du gradient électrique ( $\Delta\Psi$  vaut environ 65 mV, face intracellulaire électronégative). L'énergie dissipée par la réaction est en grande partie récupérée grâce au couplage avec la sortie endergonique d'un ion  $\text{Na}^+$  pour 3 ions  $\text{HCO}_3^-$ . Si l'on admet que la concentration de  $\text{Na}^+$  dans la cellule est de 10 mEq/l et de 150 à l'extérieur (ce qui équivaut à un  $\Delta\mu$  de 70 mV), on peut calculer la concentration intracellulaire *minimum* de  $\text{HCO}_3^-$  qui est thermodynamiquement compatible avec le cotransport de 3  $\text{HCO}_3^-$  pour 1  $\text{Na}^+$ ,

$$\text{à savoir : } 3 (\Delta\mu_{\text{HCO}_3^-} + \Delta\Psi) - (\Delta\mu_{\text{Na}^+} + \Delta\Psi) = 0,$$

$$\text{d'où : } \Delta\mu_{\text{HCO}_3^-} \approx -20 \text{ mV}$$

$$\text{et : } [\text{HCO}_3^-]_c / [\text{HCO}_3^-]_{pl} \geq 0,5,$$

soit une concentration de bicarbonate dans la cellule au moins égale ou supérieure à la moitié de celle qui existe dans le plasma.

Avantage énergétique de ce mécanisme d'abord, puisque la réabsorption de 3 ions bicarbonate implique la réabsorption *active* de 2 ions  $\text{Na}^+$  par la pompe à sodium (et non point de 3) et la réabsorption couplée (*passive*) du 3<sup>e</sup> ion  $\text{Na}^+$ . Comme la majeure partie de la réabsorption proximale du sodium correspond au processus d'acidification tubulaire discuté ici, et que, dans ce processus les deux tiers seulement du flux transcellulaire de sodium sont actifs, on calcule que 2 molécules d'ATP permettent non pas la réabsorption de 6 ions  $\text{Na}^+$  comme on l'attendait (la Na-k-ATPase transporte 3  $\text{Na}^+$  par ATP consommé), mais de 9 ions sodium. En d'autres termes, les couplages impliqués dans le processus d'acidification proximale ont pour conséquence que 1 molécule de  $\text{O}_2$  consommée par la pompe à sodium permet la réabsorption active non pas de 18 ions  $\text{Na}^+$  comme le laisse prévoir la stoechiométrie de la pompe, mais de 27 ions  $\text{Na}^+$ . Or, on savait depuis longtemps, mais sans en avoir élucidé les causes exactes, que 28 à 30 ions sodium sont réabsorbés dans le rein par oxygène consommé. Le mécanisme qui vient d'être décrit représente très certainement la principale — mais pas la seule — de ces causes.

La deuxième raison de l'importance physiologique de ce système de cotransport électrogénique  $\text{HCO}_3^-\text{-Na}^+$  concerne la régulation du pH intracellulaire. La simple diffusion passive des ions  $\text{HCO}_3^-$  hors de la cellule à travers une membrane basale librement perméable impliquerait (compte tenu d'un poten-

tiel de membrane égal ou supérieur à 65 mV), une concentration de  $\text{HCO}_3^-$  environ 10 fois plus basse dans la cellule que dans le plasma, et, par conséquent, un pH intracellulaire inférieur de 1 unité à celui du plasma. On sait cependant depuis peu que la valeur du pH dans les cellules proximales vaut environ 7,15 à 7,20, soit seulement 0,2 à 0,25 unité de moins que dans le plasma. Ceci implique que la valeur de la concentration du bicarbonate dans la cellule s'élève à 16 mEq/l lorsqu'elle est de 27 dans le plasma. Il apparaît donc que le travail thermodynamique requis par le transport endergonique de  $\text{Na}^+$  obligatoirement couplé à la sortie de  $\text{HCO}_3^-$  à travers la membrane a pour conséquence d'augmenter d'un facteur important la concentration d'équilibre de  $\text{HCO}_3^-$  dans la cellule, et donc d'y assurer une valeur du pH qui se rapproche de celle du milieu extracellulaire.

Notons encore que le système de cotransport  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  est bloqué par le DITS ainsi que par les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique. Insistons enfin sur un point : compte tenu du fait que l'acide carbonique est rapidement dissociable, il n'est nullement exclu que le système de cotransport assure la translocation de fait d'ions  $\text{OH}^-$  avec diffusion associée de  $\text{CO}_2$ , plutôt que celle d'ions  $\text{HCO}_3^-$  comme tels. Il reste aussi à établir si ce système est assujéti à des régulations physiologiques s'exerçant directement sur lui, et aussi s'il est caractéristique des seules cellules proximales du rein ou s'il se retrouve dans d'autres types cellulaires, où il pourrait remplir une fonction importante dans l'ajustement du pH intracellulaire.

F. M.

PROGRAMME DES SÉMINAIRES  
(les vendredis, de 16 h 30 à 18 h 30)

22 novembre : P. POUJEOL (Dept Biologie, C.E.A.-C.E.N.S. Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex) : Propriétés de transport et pH intracellulaire des cellules proximales isolées du rein de lapin.

C. FRELIN (Centre de Biochimie, Fac. Sci., 06034 Nice Cedex) : Caractérisation biochimique de l'échangeur sodium-proton et du canal sodium sensible à l'amiloride.

M.M. PACCOLA (Inst. Pharmacologie de l'Univ. de Lausanne, 21, rue Bugnon, CH 1011 Lausanne, Suisse) : Effet de l'aldostérone sur le transport de sodium et sur la Na-K-ATPase dans la lignée cellulaire épithéliale  $A_6$ .

29 Novembre : A. TRAUTMANN (Lab. Neurobiologie, E.N.S., rue d'Ulm, Paris 5<sup>e</sup>) : Electrophysiologie moléculaire d'une jonction de type « gap ».

J. MARCHETTI (Lab. Physiologie cellulaire, Collège de France, 75231 Paris Cedex 05) : Données récentes sur le fonctionnement du système kallibréine-kinine rénal.

G. FRIEDLANDER (Lab. Physiologie rénale, U.P. 7, Fac. Médecine Xavier-Bichat, 16, rue Henri-Huchard, 75018 Paris) : Effet de la somatostatine, des prostaglandines et des agonistes  $\alpha_2$  adrénergiques sur l'accumulation d'AMP cyclique dans les cellules MDCK en culture.

6 décembre : G. GUILLON (Centre C.N.R.S./I.N.S.E.R.M., Pharmacologie-Endocrinologie, rue de la Cardonille, 34033 Montpellier Cedex) : Etude de l'action de la vasopressine sur le métabolisme des polyphosphoinositols-lipides de cellules de glande mammaire en culture : rôle des molécules protéiques liant le GTP.

J.L. COUSIN (Faculté de Médecine Pasteur, U. 210, I.N.S.E.R.M., Nice) : Internalisation hormone-dépendante et recyclage du récepteur de l'insuline dans les cellules d'hépatome humain.

13 décembre : P. PRADELLES (Dept Biologie, C.E.A.-C.E.N.S. Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex) : L'apport de l'immunologie analytique à la pharmacologie.

A. DI STEFANO (Dept Biologie, C.E.A.-C.E.N.S. Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex) : Etude électrophysiologique du transport de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  par la partie corticale du segment large de la branche ascendante de lapin.

M. LE HIR (Dept Innere Medizin, Kantospital, Hebelstrasse 1, 4056, Bâle) : Métabolisme, transport et effets physiologiques de l'adénosine dans le rein.

#### TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Les recherches que nous poursuivons au laboratoire de physiologie cellulaire portent sur le fonctionnement des cellules tubulaires du rein et sa régulation par les hormones. Ces recherches mettent en œuvre des microméthodes biochimiques, enzymatiques ou physiologiques adaptées aux dimensions d'un fragment unique de tubule isolé par microdissection de tissu rénal traité par la collagénase.

Nous distinguerons dans cet exposé, parmi les résultats obtenus au cours de l'année écoulée, trois types de contributions. Des études enzymatiques d'abord, qui ont consisté à mettre en évidence sur segments isolés la présence d'enzymes spécifiques par leur activité, puis d'en établir la distribution le long des néphrons. Nous évoquerons ensuite les résultats obtenus visant à caractériser les sites et le mécanisme d'action du facteur natriurétique atrial sur le

rein. Enfin, nous rapporterons les contributions du laboratoire à la régulation de l'activité de la Na-K-ATPase rénale par les hormones thyroïdiennes.

## I. DISTRIBUTION D'ENZYMES SPÉCIFIQUES LE LONG DU NÉPHRON

### a) *Enzyme de conversion et kininases* (J. MARCHETTI, S. ROSEAU, F. PRADDAUDE)

Après avoir établi dans un premier temps le segment (tubule connecteur) qui produit la bradykinine à partir de son précurseur sous l'action de la kalllicréine, il importait de rechercher la localisation des enzymes susceptibles de dégrader cette hormone ; on sait que plusieurs peptidases manifestent des activités kininasiques, en particulier la kininase II, plus connue sous le nom d'enzyme de conversion (EC), qui catalyse la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II.

Les activités kininasiques ont été mesurées sur segments tubulaires isolés par leur aptitude à inactiver la bradykinine (mesurée par radioimmunoessai) ; l'effet d'inhibiteurs spécifiques (captopril) ou d'agents chélateurs (l'enzyme de conversion est une metallo-enzyme) a servi à discriminer entre les différentes enzymes connues. En outre, l'enzyme de conversion a été également recherchée par son activité hydrolytique d'un tripeptide de synthèse marqué, l'hippurylglycylglycine ( $^3\text{H}$ -HGG).

Les résultats indiquent une importante activité kininasique dans le tubule proximal (PCT et PR), et une activité plus faible bien que notable, dans le tubule collecteur médullaire (MCT). L'enzyme proximale est inhibée par les agents chélateurs, comme l'enzyme de conversion, mais non par le captopril à faible concentration, contrairement à lui. La majeure partie de l'activité kininasique mesurée dans le tubule proximal correspond donc à une metalloenzyme différente de l'enzyme de conversion. L'hydrolyse du  $^3\text{H}$ -HGG montre qu'il existe aussi de l'enzyme de conversion dans le néphron : EC est localisée exclusivement dans le tubule proximal où son activité présente un gradient croissant du début du PCT jusque dans la PR. Enfin, l'activité kininasique mesurée dans le canal collecteur médullaire ne correspond ni à la kininase proximale (elle est insensible aux agents chélateurs dans MCT) ni à l'enzyme de conversion ( $^3\text{H}$ -HGG n'est pas hydrolysé par le MCT) ; il s'agit d'une activité enzymatique non décrite jusqu'ici et qui pourrait être impliquée dans l'inactivation par le tubule collecteur médullaire de la bradykinine formée en amont dans le néphron sous l'action de la kalllicréine.

b) *Enzymes de synthèse des prostaglandines*

(M. IMBERT-TEBOUL, S. SIAUME)

On sait que le rein est une source importante de prostaglandines, et que leur synthèse implique l'action d'une cyclooxygénase sur l'acide arachidonique. Il a été établi que la majeure partie des PG produite par le rein provient des cellules interstitielles et une fraction mineure seulement des cellules épithéliales tubulaires. A l'aide d'un dosage radioimmunologique miniaturisé de PGE<sub>2</sub>, il a été recherché sur segments tubulaires isolés in vitro quelles étaient les portions du néphron capables de synthétiser PGE<sub>2</sub> en présence d'arachidonate ajouté au milieu d'incubation. Il a été trouvé, chez le lapin, que deux segments seulement du néphron produisent PGE<sub>2</sub> en quantités notables : le tubule collecteur d'une part, ce que l'on soupçonnait déjà ; le segment grêle descendant de l'anse de Henle d'autre part, ce qui est inattendu. Il semble donc que les autres segments du néphron, y compris le segment grêle ascendant, soient dépourvus de cyclooxygénase. Il reste bien entendu à déterminer les mécanismes de régulation qui contrôlent la synthèse de PGE<sub>2</sub> dans le segment grêle descendant, et le rôle physiologique exact de cette synthèse.

c) *ATPase anionique et ATPase à proton*

(A. DOUCET, M. BEN ABDELKHALEK et M. AÏT-MOHAMED)

Si les transports actifs d'ions sont, sur le plan quantitatif, principalement couplés au métabolisme via l'activité de la Na-K-ATPase (la pompe à sodium), on soupçonne aujourd'hui que d'autres ATPases de transport doivent également exister dans les membranes plasmiques de certaines cellules au moins, notamment, outre la Ca-ATPase (ubiquitaire) et la K-H-ATPase gastrique, des ATPases impliquées dans le transport des protons et des anions. La mise en évidence de telles fractions enzymatiques est cependant difficile en raison des activités ATPasiques élevées présentes dans les mitochondries ou les lysosomes de toute cellule. Le recours à des fractionnements cellulaires associé à l'emploi d'inhibiteurs spécifiques permet cependant de surmonter les difficultés inhérentes à ce genre de problème. C'est l'approche qui a été utilisée pour étudier sur des fractions cellulaires d'homogénat de tissu rénal d'abord, puis sur des segments isolés de néphrons, deux enzymes qui pourraient être impliquées dans des transports actifs d'ions : une ATPase anionique (stimulée par le sulfite) et une ATPase à proton (inhibée par le N-Ethyl-Maléimide, NEM).

Studiées sur tubules isolés, ces deux activités ATPasiques, bien que distinctes l'une de l'autre, se retrouvent principalement dans les segments des néphrons qui sont impliqués dans l'acidification du fluide tubulaire (tubule contourné proximal, canal collecteur) et qui contiennent des cellules intercalaires, riches en mitochondries (tubule connecteur, CCT). A noter que le

segment large ascendant des anses (MAL, CAL) ne contient pas d'ATPase à protons NEM sensible, malgré un contenu particulièrement élevé en mitochondries et en Na-K-ATPase.

Le rôle physiologique éventuel de ces enzymes de transport sera étudié en analysant les variations de leur activité associées à des traitements connus pour faire varier l'excrétion acide par le rein.

\*

\*\*

## II. PEPTIDE NATRIURÉTIQUE ATRIAL (ANP)

La découverte récente d'un facteur hormonal nouveau intervenant dans la régulation de la pression artérielle et de la balance hydrominérale, l'ANP, a suscité un nombre considérable de travaux au cours des deux dernières années. Cette hormone peptidique, dont la structure a été établie et la synthèse effectuée, est normalement produite dans les parois auriculaires cardiaques, où elle est libérée lorsque la pression sanguine dans les oreillettes s'élève. L'hormone augmente dans la circulation dans les situations d'expansion extra-cellulaire et serait responsable de la réponse natriurétique du rein que l'on a reconnue depuis longtemps dans cette situation et attribuée à un facteur natriurétique inconnu (3<sup>e</sup> facteur). La disposition d'ANP de synthèse et d'ANP marqué à très haute radioactivité spécifique par <sup>125</sup>I rend possible l'étude des sites et du mécanisme d'action de cette hormone dans le rein. Les études physiologiques conduites in vivo avec cette hormone sont rendues difficiles à interpréter en raison de l'action vasomotrice importante qu'elle produit dans le rein et de l'augmentation massive de filtration glomérulaire qui en résulte. Il est dès lors difficile d'établir si l'augmentation de l'excrétion de sodium et la polyurie observées impliquent ou non une action de l'hormone sur les cellules tubulaires elles-mêmes.

### a) Sites de liaison de l'ANP dans le rein

(D. BUTLEN, M. MISTAOU)

Le peptide marqué par <sup>125</sup>I a été utilisé pour rechercher une liaison spécifique de l'hormone in vitro à des récepteurs éventuels sur des échantillons contenant soit des glomérules, soit des fragments de tubules isolés par microdissection.

A basse température, les glomérules fixent l'ANP iodé (séquence 1-28 de l' $\alpha$ -atrine) selon une cinétique saturable en fonction du temps et de la dose. Le  $K_D$  apparent de liaison (0,6 nM) indique une affinité élevée. La spécificité de cette liaison est démontrée par le fait qu'elle est déplacée par les analogues de structure de l'ANP biologiquement actifs, mais pas par d'autres hormones

polypeptidiques. La capacité de liaison maximale (nombre de sites spécifiques) est de 20 attomoles par glomérule. Il a été observé que les glomérules inactivent très rapidement l'ANP, de sorte que la liaison est difficile à étudier à 25 ou 37 °C.

Dans les tubules, par contre, aucune liaison spécifique de l'ANP n'a pu être mise en évidence ni chez le lapin, ni chez le rat, quel que soit le segment des néphrons étudié (seul le canal collecteur papillaire n'a pu être testé, faute de pouvoir être disséqué). Ces études de liaison suggèrent donc que l'ANP n'exercerait pas d'effet direct sur les tubules par l'intermédiaire d'une liaison à des récepteurs spécifiques.

#### b) *Mécanisme d'action de l'ANP dans le rein*

(D. CHABARDÈS, M. MONTÉGUT)

Des travaux récents ayant montré que l'ANP induit une augmentation de synthèse de GMP cyclique (cGMP) dans certains types de cellules-cible et sur des suspensions de glomérules, il a été nécessaire de mettre au point une microméthode qui permette de mesurer *in vitro* la production endogène de ce nucléotide cyclique par les glomérules isolés ou des fragments de tubule en survie. Le dosage radioimmunologique du cGMP est réalisé dans des conditions comparables à celui du cAMP. L'essai permet de doser 1 fmoles de cGMP ; il est arrêté après 4 minutes d'incubation de la structure à 35 °C en présence d'hormone. Sur des glomérules isolés, l'ANP stimule effectivement la production endogène de cGMP : le seuil de réponse est obtenu avec 1 nM d'hormone, le  $K_D$  apparent est de l'ordre de 10 nM et l'effet maximum correspond à un contenu de cGMP de 10 fmoles/glomérule, c'est-à-dire 20 à 25 fois supérieur à ceux mesurés en l'absence d'hormone. La carbamylcholine, mais non l'histamine, fait aussi augmenter (bien que plus faiblement que l'ANP) le contenu des glomérules en cGMP.

Lorsque les effets de l'ANP ont été recherchés, dans les mêmes conditions, sur le contenu en cGMP d'échantillons tubulaires, aucun effet n'a pu être décelé sur aucun segment, y compris le tubule collecteur, même pour de fortes doses d'ANP.

Enfin, contrairement à ce qui a été décrit sur d'autres types cellulaires, l'ANP n'affecte pas le contenu des glomérules ou des tubules collecteurs en cAMP, soit dans les conditions de base, soit lorsque l'adénylate cyclase a été stimulée par la forskoline ou la vasopressine (CCT, MCT).

Cette étude vérifie donc que l'augmentation de cGMP intra-cellulaire correspond bien à un effet de l'hormone atriale sur les glomérules. Comme dans le cas de la liaison de l'ANP iodé, elle suggère que cette hormone n'exerce pas d'effet direct sur les segments tubulaires du rein, en particulier les segments corticaux et médullaires externes des tubules collecteurs.

### III. RÉGULATION DE LA Na-K-ATPase TUBULAIRE PAR L'HORMONE THYROÏDIENNE

Cette étude a été conduite par C. Barlet sous la direction de A. Doucet. La thyroïdectomie (TX) chez les mammifères entraîne une baisse de l'activité de la Na-K-ATPase rénale, une augmentation de l'excrétion urinaire d'eau et de sel (malgré une baisse de la filtration glomérulaire) et, à long terme, une involution du rein. Les recherches dont les principaux résultats sont résumés ci-dessous ont été entreprises pour rechercher :

- a) si la baisse d'activité de la Na-K-ATPase est commune à tous les types cellulaires du rein ou limitée à certains d'entre-eux ;
- b) dans quelles conditions l'administration d'hormone thyroïdienne aux animaux peut restaurer les effets consécutifs à la thyroïdectomie ; enfin,
- c) si des interactions entre aldostérone et hormones thyroïdiennes peuvent être mises en évidence *in vivo* et *in vitro*.

#### a) Sites d'action des hormones thyroïdiennes le long des néphrons.

Une semaine après la thyroïdectomie du rat ou du lapin, la mesure de l'activité Na-K-ATPasiq ou celle de la liaison d'ouabaine tritiée sur des segments de néphrons révèle que la quantité d'enzyme présente par mm de tubule est fortement abaissée dans le tubule proximal (PCT et PR) et surtout dans le tubule collecteur (CCT et MCT), alors qu'elle est inchangée dans les autres segments du néphron. La baisse observée touche également l'activité et la quantité de l'enzyme présente, de sorte que son activité spécifique n'est pas affectée. Si les animaux sont opérés depuis plusieurs mois, alors on note une atrophie marquée du rein et une diminution de l'activité Na-K-ATPasiq qui touche également les autres segments du rein (MAL, CAL, DCT, etc.). Les effets précoces de l'insuffisance thyroïdienne aiguë (TX depuis environ 8 jours) sont donc de localisation sélective.

#### b) Effets de l'administration de $T_3$

La cinétique de restauration de l'activité Na-K-ATPasiq après une injection unique de  $T_3$  à des animaux TX depuis 8 jours a été étudiée en fonction de la durée d'action et de la dose d'hormone injectée. Des doses de  $T_3$  égales ou supérieures à 10 ng Kg-1 suffisent à restaurer complètement l'activité de l'enzyme dans les segments où elle était abaissée (PCT et tubules collecteurs). L'enzyme des autres segments n'est pas affectée. Si on étudie le décours temporel de cette restauration *in vivo* par l'hormone, on obtient des courbes différentes dans le tubule proximal et le tubule collecteur. Dans le PCT, l'activité s'élève après une latence de 9 à 12 h environ et atteint son maximum 24 h après l'injection hormonale. Dans le tubule collecteur, la réponse est plus rapide et présente deux phases successives : une première augmentation

apparaît après 1 h et atteint un maximum en 3 h environ (elle correspond alors à environ 50 pour 100 de la réponse totale) ; une deuxième phase se développe ensuite entre 12 et 24 h après l'injection de  $T_3$ . Il faut noter que l'effet de l'hormone sur l'enzyme est toujours complètement développée en moins de 48 h, c'est-à-dire avant que l'effet de l'hormone sur la filtration glomérulaire ait commencé à se manifester. Un tel décalage dans le temps démontre que l'effet de l'hormone sur la Na-K-ATPase tubulaire ne peut pas être la conséquence indirecte de son action sur la filtration glomérulaire, par l'intermédiaire d'une pénétration accrue de sodium dans les cellules tubulaires par leur face apicale.

c) *Interactions aldostérone-hormone thyroïdienne*

Les observations suivantes, faites antérieurement au laboratoire par A. Doucet et collaborateurs suggèrent que la 1<sup>re</sup> phase de l'action de la  $T_3$  sur le canal collecteur pourrait résulter d'une interaction avec les minéralo-corticoïdes surrénaliens : Aldostérone et  $T_3$  stimulent toutes deux l'activité de la Na-K-ATPase du tubule collecteur et le font toutes deux avec des cinétiques temporelles comparables (entre 1 et 3 heures après leur injection). D'autre part, la thyroïdectomie entraîne une diminution importante du taux d'aldostérone dans le plasma. L'étude de ces interrelations a donc été entreprise et quelques résultats préliminaires méritent d'être signalés : 1) chez l'animal TX, la  $T_3$  restaure la Na-K-ATPase du collecteur sans faire monter l'aldostérone plasmatique, ce qui exclut un effet indirect entièrement induit par l'aldostérone ; 2) chez l'animal ADX et TX, l'effet de l'injection d'aldostérone est potentialisé par l'injection simultanée de  $T_3$  ; 3) ajoutée in vitro dans le milieu d'incubation de tubules collecteurs en survie, l'aldostérone seule n'a pas d'effet sur la Na-K-ATPase, par contre, elle stimule très fortement l'activité de cette enzyme après une latence de moins d'une heure à 37 °C si l'on introduit simultanément de la  $T_3$  (1 nM) dans le milieu de survie. Ces effets de l'aldostérone sont supprimés en présence d'inhibiteur de la synthèse des protéines. Ces dernières expériences démontrent que l'effet des deux hormones s'exerce bien directement sur les cellules tubulaires isolées in vitro ; par ce fait même, elles sont encourageantes, même si les mécanismes moléculaires en cause restent à découvrir.

PUBLICATIONS

D. BUTLEN and F. MOREL. *Glucagon receptors along the nephron : <sup>125</sup>I-Glucagon binding in rat tubules (Pflügers Arch., 404, 346-353, 1985).*

C. BARLET, M. BEN ABDELKHALEK and A. DOUCET. *Sites of thyroid hormone action on Na-K-ATPase along the rabbit nephron (Pflügers Arch., 405, 52-57, 1985).*

MM. TRINH-TRANG-TAN, L. BANKIR, G. EL MERNISSI, M. IMBERT-TEBOUL, M. MONTEGUT, S. SIAUME and F. MOREL. *Influence of chronic ADH treatment on adenylate cyclase and ATPase activity in distal nephron segments of diabetes insipidus Brattleboro rats.* (Pflügers Archiv., 405, 216-222, 1985).

M.G. BRUNETTE, F. EL MERNISSI and A. DOUCET. *Renal sodium transport in vitamin D resistant hypophosphatemic rickets* (Can. J. Physiol. Pharmacol., 63, 1339-1344, 1985).

A. DOUCET et G. EL MERNISSI. *Site et mécanisme de régulation de la Na-K-ATPase tubulaire par l'aldostérone* (Néphrologie, 6, 119-122, 1985).

A. DOUCET and C. BARLET. *Evidence for differences in the sensitivity to ouabain of Na-K-ATPase along the nephrons of rabbit kidney* (J. Biol. Chem., 261, 993-995, 1986).

R. RAJERISON, M. FAURE and F. MOREL. *Effects of temperature, ouabain and diuretics on the cell sodium and potassium contents of isolated rat kidney tubules* (Pflügers Arch. Eur. J. Physiol., 406, 285-290, 1986).

R. RAJERISON, M. FAURE and F. MOREL. *Effects of external potassium concentration on the cell sodium and potassium contents of isolated rat kidney tubules* (Pflügers Arch. Eur. J. Physiol., 406, 291-295, 1986).

M. CASTAING, F. MOREL and J.M. LEHN. *Transport of alkaline cations through thin lipid membranes by (222)C<sub>10</sub>-cryptand, an ionizable mobile carrier* (J. Membr. Biol., 89, 251-267, 1986).

F. MOREL and A. DOUCET. *Hormonal control of kidney functions at the cell level* (Physiol. Rev., 66 (2), 377-468, 1986).

M. BEN ABDELKHALEK, C. BARLET and A. DOUCET. *Presence of extra-mitochondrial anion simulated ATPase in the rabbit kidney : localization along the nephron and effect of corticosteroids* (J. Membr. Biol., 89, 225-240, 1986).

M. IMBERT-TEBOUL, S. PEREZ-SIAUME and F. MOREL. *Sites of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) synthesis along the rabbit nephron* (Mol. a. Cell. Endocr., 45, 1-10, 1986).

S. JARD, D. BUTLEN, B. CANTAU, G. GUILLON, J. MARIE and C. ROY. *The mechanism of action of antidiuretic hormone* (Advances in Nephrology, 13, 163-177, 1984).

F. MOREL. *L'Essor de la Biologie. 40<sup>e</sup> anniversaire de la Fondation du C.E.A. (Maison de la Chimie, oct. 1985, pp. 136-142).*

#### MISSIONS, CONFÉRENCES

Dans le cadre d'un Congrès de Physiologie organisé à Budapest sous l'égide de l'I.U.P.S., les 3 et 4 juillet 1985, Monsieur François MOREL a fait l'un des Exposés introductifs sur invitation. Il a présidé en novembre 1985, à Francfort, la Séance Inaugurale d'un Colloque International de Physiologie Rénale organisé à l'occasion du 60<sup>e</sup> Anniversaire du Professeur ULLRICH. En avril 1986, il a effectué une mission de travail à Munich. Il a été l'un des organisateurs du 10<sup>e</sup> Colloque International « Hormones et Régulation Cellulaire » qui s'est tenu au Mont Sainte-Odile sous l'égide de l'I.N.S.E.R.M., du 30 septembre au 3 octobre.

Mademoiselle Danielle CHABARDES a effectué une mission de travail à l'Institut de Pharmacologie de Lausanne, où elle a donné un Séminaire sur invitation.

Divers membres du laboratoire ont participé aux enseignements suivants : A. DOUCET a assuré 12 leçons de Physiologie sur la Régulation Hormonale des Fonctions Rénales dans une unité de valeur d'Endocrinologie à Paris 6. Monsieur Daniel BUTLEN a participé en 1985-1986 aux Enseignements du Centre de Préparation à l'Agrégation de Sciences Naturelles de l'Université de Paris 6.

Plusieurs membres du laboratoire (D. BUTLEN, A. DOUCET, G. MARCHETTI, F. MOREL et R. RAJERISON) ont contribué pour environ 25 heures aux Enseignements théoriques du D.E.A. de Physiologie et Physiopathologie Rénales de l'Université de Paris 7. Monsieur D. BUTLEN a donné deux heures de cours dans le cadre du D.E.A. de Pharmacologie de Paris 6.

#### CONVENTIONS, PROMOTIONS ET DISTINCTIONS

L'Association au C.N.R.S. du Laboratoire de Physiologie cellulaire a été renouvelée pour 4 ans, à partir de janvier 1986, sous la dénomination d'U.A. de Biochimie Fonctionnelle des Cellules Rénales.

Monsieur A. DOUCET a reçu le Prix de Néphrologie de la Fondation pour la Recherche Médicale.

Monsieur F. MOREL a été fait Membre d'Honneur de la Société Hongroise de Physiologie à l'occasion du 50<sup>e</sup> Anniversaire de sa fondation.

GROUPE DE NEUROENDOCRINOLOGIE CELLULAIRE  
ET MOLÉCULAIRE, U.A. C.N.R.S. 04 1115

Responsable : Madame A. TIXIER-VIDAL, Directeur de Recherche C.N.R.S.

RAPPORT D'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE  
Juin 1985 - Juin 1986

Les résultats publiés au cours de l'année se répartissent selon les deux thèmes de recherche développés parallèlement dans notre groupe.

I. *MÉCANISMES MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES  
DE LA SÉCRÉTION DE LA PROLACTINE  
ET DE L'HORMONE DE CROISSANCE*

Dans le cadre de nos recherches sur le contrôle de l'expression des gènes de la prolactine et de l'hormone de croissance (rPRL, rGH), l'état de méthylation du DNA a été comparé dans trois lignées continues de cellules antéhypophysaires qui diffèrent entre elles par les taux de sécrétion respectifs de rPRL et rGH : la lignée GH3/B6 qui sécrète majoritairement rPRL, la lignée GC qui sécrète majoritairement rGH et le variant GH3CDL sélectionné par culture prolongée sur un milieu déplété en hormones et qui sécrète des quantités infimes de rPRL et rGH. L'emploi d'enzymes de restriction appropriées (Hpa II et Msp I) a montré une hypométhylation des gènes de rPRL dans la lignée GH3/B6 et de rGH dans la lignée GC. Par contre, dans la lignée GH3CDL, les deux gènes sont hyperméthylés. Ceci suggère une relation inverse entre le degré de méthylation de ces gènes et leur niveau d'expression. Cependant, le traitement des cellules par la 5-azacytidine, qui décroît la méthylation du DNA, est capable de réactiver l'expression du rPRL et rGH par le variant GH3CDL, mais pas par la lignée GC. De plus, l'effet du traitement des cellules GH3CDL persiste et s'amplifie après le retrait de la drogue. On en conclut que, outre la méthylation du DNA, d'autres mécanismes génétiques ou épigénétiques sont impliqués dans la régulation de l'expression de ces deux gènes (Laverrière et al., 1986).

Dans le cadre de nos recherches sur les sites de liaison antéhypophysaires de la Thyrolibérine (TRH), des arguments nouveaux pour une « internalisation » *in vivo* du TRH dans ses cellules cibles ont été obtenus par immunocytochimie combinée à la cryoultramicrotomie dans l'antéhypophyse de rat normal (MOREL et al., 1985). Le rôle direct de l'hormone thyroïdienne dans la régulation négative des sites de liaison du TRH par les cellules GH3/B6 a été mis en évidence, en absence de synergie avec d'autres hormones (GOURDJI, 1985).

Enfin, dans le cadre de nos recherches sur la lignée VEHI, obtenue par insertion des séquences codantes de la GH humaine (hGH) dans la lignée simienne fibroblastique VERO, C. TOUGARD a montré par immunocytochimie ultrastructurale que dans les cellules VEHI, hGH est transloquée à l'intérieur du reticulum rugueux, transportée dans le reticulum golgien, puis libérée par le moyen de petites vésicules, mais n'est pas stockée dans des grains de sécrétion. Comme on pouvait s'y attendre pour des fibroblastes, ces cellules, qui sont capables d'exporter la hGH dans le milieu, ne possèdent pas les mécanismes génétiques permettant d'élaborer des grains de sécrétion (TOUGARD et al. 1986).

## II. DÉVELOPPEMENT DES NEURONES HYPOTHALAMIQUES FOETAUX

Les recherches conduites depuis plusieurs années sur le contrôle du développement neuronal par des facteurs diffusibles de l'environnement cellulaire et notamment des hormones, ont conduit à la publication de plusieurs résultats originaux. Ceux-ci ont été obtenus grâce à la mise au point des conditions de culture en milieu chimiquement défini, précédemment réalisée au laboratoire. L'attention a été concentrée sur les phases terminales du développement neuronal : élongation et branchement neuritique, synaptogénèse.

Nous avons précédemment mis en évidence l'effet direct de la triiodothyronine (T3) sur la morphogénèse des neurones dopaminergiques de l'hypothalamus (PUYMIRAT et al., 1983). Ceci soulevait plusieurs questions auxquelles des réponses ont pu être apportées. C'est ainsi qu'on a montré que l'effet de la T3 sur la morphogénèse des neurones dopaminergiques s'exerce différemment au niveau du mésencéphale où l'élongation et le branchement neuritiques ne sont pas affectés par l'hormone qui agit uniquement sur la croissance des péricarya. On montre donc à la fois une spécificité régionale et une dissociation des effets de la T3 sur le corps cellulaire d'une part, et la morphogénèse neuritique d'autre part (PUYMIRAT et al., 1985). Le problème du mécanisme d'action de la T3 a été également abordé. On a montré que cette hormone stimule la production dans le milieu des « insulin like growth factors » IGF I et II, mais pas de leurs protéines liantes (BINOUX et al., 1985). Le rôle des IGFs sur le développement neuronal est donc à l'étude.

Des facteurs diffusibles actifs sur la maturation morphologique et fonctionnelle des synapses dans les cultures hypothalamiques ont été identifiés. La capacité de former des synapses requiert la même durée de culture, quelle que soit la composition du milieu ; on peut donc considérer qu'elle représente l'expression d'un programme génétique intrinsèque. Par contre, la « qualité » des synapses est régulée par des facteurs épigénétiques solubles. Deux acides gras polyinsaturés, acides arachidonique et docosa-hexaénoïque, sont des fac-

teurs clés pour la construction des vésicules synaptiques, alors que la T3, de même que la corticostérone, est sans effet. Par contre, ces deux hormones sont indispensables conjointement avec les acides gras polyinsaturés pour assurer le fonctionnement synaptique testé par la libération d'un neuropeptide en réponse à une dépolarisation chimique brève. Ceci s'accompagne de mouvements rapides des vésicules synaptiques, attestés par leur déplétion massive suivie par leur restauration, lors de la repolarisation (TIXIER-VIDAL et al., 1986).

Par ailleurs, les recherches exploitant le modèle de cultures de cellules hypothalamiques pour une étude de la biosynthèse et de la libération du TRH se sont poursuivies. Le rôle éventuel des enzymes tissulaires de dégradation du TRH dans la libération de ce neuropeptide a été examiné. Il s'agit de la pyroglutamate aminopeptidase (PAP) et de la « post-proline cleaving enzyme » (PPCE), dont on peut doser l'activité par des substrats fluorogéniques et bloquer l'activité par des inhibiteurs spécifiques. On a montré que ces deux enzymes ne sont pas co-libérées avec le TRH lors de la dépolarisation chimique et que celui-ci n'est pas dégradé dans le milieu. D'autre part, les conditions pour le blocage irréversible *in vivo* de ces enzymes par un inhibiteur spécifique, non toxique pour les cellules, ont été établies. Dans ces conditions, le niveau du TRH intracellulaire est accru, de même que la quantité du TRH libérée dans les conditions basales ou stimulées. Ceci suggère que les enzymes intracellulaires de dégradation participent à la régulation du renouvellement du TRH, selon un mécanisme et à des étapes de maturation qui restent à déterminer (FAIVRE-BAUMAN et al., 1986).

#### PUBLICATIONS

M. BINOUX, A. FAIVRE-BAUMAN, C. LASSARRE, A. BARRET and A. TIXIER-VIDAL. *Triiodothyronine stimulates the production of insulin-like growth factor (IGF) by fetal hypothalamus cells cultured in serum-free medium (Developm. Brain Res., 21, pp. 319-321, 1985).*

S. BENJELLOUM-TOUIMI, C.M. JACQUE, P. DERER, F. DE VITRY, R. MAUNOURY and P. DUPOUEY. *Evidence that mouse astrocytes may be derived from the radial glia. An immuno-histochemical study of the cerebellum in the normal and reeler mouse (J. Neuroimmunol., 9, pp. 1-2, 1985).*

C. TOUGARD, D. LOUVARD, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL. *Immunocytochemical identification of membrane compartments involved in secretory process and endocytosis in prolactin cells. Section I. The functional ultrastructure of prolactin cells (In : « Prolactin Basic and Clinical Correlates » R.M. MacLeod, M.O. Thorner and U. Scapagnini, eds, Fidia Res. Series, vol. 1, pp. 37-44, 1985).*

J.N. LAVERRIERE, M. MULLER, C. TOUGARD, N. BUISSON, A. TIXIER-VIDAL, J.A. MARTIAL and D. GOURDJI. *DNA methylation and expression of prolactin and growth hormone genes in a rat pituitary strain selected on steroid-depleted medium. Section IV. Modification of prolactin production by steroids* (In : « Prolactin, Basic and Clinical Correlates », R.M. MacLeod, M.O. Thorner and U. Scapagnini, eds, Filia Res. Series, vol. 1, pp. 271-281, 1985).

J.N. LAVERRIERE, A. MORIN, N. BUISSON, A. TIXIER-VIDAL and D. GOURDJI. *Regulation of the prolactin gene transcription by thyroliberin in GH3B6 rat pituitary cells* (In : « Regulatory Peptides in Digestive, Nervous and Endocrine Systems », I.N.S.E.R.M. Symposium n° 25, M.J.M. Lewin and S. Bonfils, eds, Elsevier Science Publish. B.V. pp. 111-115, 1985).

D. GOURDJI, D. BATAILLE, N. BUISSON and A. TIXIER-VIDAL. *GH rat pituitary strains as target models for regulatory peptides. Interaction of TRH and VIP with peripheral hormones* (In : Regulatory Peptides in Digestive, Nervous and Endocrine Systems. I.N.S.E.R.M. Symposium n° 25, ed. by M.J.M. Lewin and S. Bonfils, Elsevier Science Publisher, pp. 25-33, 1985).

G. MOREL, D. GOURDJI, D. GROUSELLE, N. BRUNET, A. TIXIER-VIDAL and P. DUBOIS. *Immunocytochemical evidence for in vivo internalization of thyroliberin into rat pituitary target cells* (*Neuroendocrinology*, 41, pp. 312-320, 1985).

D. GOURDJI. *Multihormonal regulation of the pituitary gland, binding and secretory responses to hypothalamic neuropeptides in rat GH pituitary strains in culture* (*Neurochem. Int.*, 7, pp. 979-994, 1985).

J. PUYMIRAT. *Effects of Disthyroidism on central catecholaminergic neurons* (*Neurochem. Int.*, 7, pp. 969-977, 1985).

J. PUYMIRAT, A. FAIVRE-BAUMAN, A. BARRET, C. LOUDES and A. TIXIER-VIDAL. *Does triiodothyronine influence the differentiation of fetal mouse mesencephalic dopaminergic neurons cultured in chemically defined medium ?* (*Development. Brains Res.*, 23, pp. 315-317, 1985).

I. GERENDAI, A. NEMESKERI, A. FAIVRE-BAUMAN, D. GROUSELLE and A. TIXIER-VIDAL. *Effect of unilateral or bilateral thyroidectomy on TRH content of hypothalamus halves* (*J. Endocrinol. Invest.*, 8, pp. 321-323, 1985).

A. TIXIER-VIDAL, R. PICART, C. LOUDES and A. FAIVRE-BAUMAN. *Effects of polyunsaturated fatty acids and hormones on synaptogenesis in serum-free medium cultures of mouse fetal hypothalamic cells* (*Neurosci.*, 17, pp. 115-132, 1986).

A. FAIVRE-BAUMAN, C. LOUDES, A. BARRET, A. TIXIER-VIDAL and K. BAUER. *Possible role of neuropeptide degrading enzymes on thyroliberin secretion in fetal hypothalamic cultures grown in serum-free medium* (*Neuropeptides*, 7, pp. 125-138, 1986).

J.N. LAVERRIERE, M. MULLER, N. BUISSON, C. TOUGARD, A. TIXIER-VIDAL, J.A. MARTIAL and D. GOURDJI. *Differential implication of DNA methylation in rat prolactin and rat growth hormone gene expressions : a comparison between rat pituitary cell strains* (*Endocrinology*, 118, pp. 198-206, 1986).

J.N. LAVERRIERE, A. MORIN, N. BUISSON, A. TIXIER-VIDAL, D. GOURDJI, M. MULLER, A.T. TRUONG et J.A. MARTIAL. *Régulation de l'expression des gènes de la prolactine et de l'hormone de croissance dans des cellules hypophysaires en culture* (*Annales d'Endocrinologie*, 47, 1986).

A. TIXIER-VIDAL and C. TOUGARD. *Membrane compartments and secretory pathway in prolactin cells* (*In : « Pars Distalis of the Pituitary Gland. Structure, Function and Regulation »*, ed. by F. Yoshimura and A. Gorbman, Elsevier Science Publish, pp. 347-354, 1986).

C. TOUGARD et R. PICART. *Use of preembedding ultrastructural immunocytochemistry in the localization of a secretory product and membrane proteins in cultured prolactin cells* (*Am. J. Anat.*, 175, pp. 161-177, 1986).

A. TIXIER-VIDAL, C. TOUGARD and A. FAIVRE-BAUMAN. *Membrane traffic in relation with release mechanism in neuroendocrine cells in culture* (*In : « Neuroendocrine Molecular Biology »*, Plenum Publ. Corp., pp. 353-366, 1986).

C. TOUGARD, F. GUETTE, D. GOURDJI, J.H. LUPKER et A. TIXIER-VIDAL. *Evidences immunocytochimiques pour un transfert et un transit de hGH dans le reticulum endoplasmique de cellules de rein de singe transfectées par un plasmide recombinant* (*In : « Production d'agents thérapeutiques par génie génétique : Quo Vadis ? Exemple de l'hormone de croissance et de son facteur de libération »*, A. Joyeaux, G. Leygue, M. Morre, R. Roncucci, P.H. Schmelck, ed., pp. 461-463, 1986).

#### CONGRÈS

Colloque I.N.S.E.R.M. Animation de la Recherche : Génétique Moléculaire et Pathologie du Système Nerveux, Bussières, France, juin 1985, A. FAIVRE-BAUMAN, J. PUYMIRAT, F. DE VITRY.

XII International Anatomical Congress, Londres, Angleterre, 11-17 août 1985, A. TIXIER-VIDAL.

Autumn Conference of the British Society for Cell Biology. The Extracellular Matrix : Receptors, Genes and Signals, 1-5 septembre 1985, Londres, Angleterre. N. BRUNET DE CARVALHO.

Neuroendocrine Molecular Biology. 13th Annual Meeting of the International Foundation for Biochemical Endocrinology. Edimbourg, Ecosse, 16-20 septembre 1985. A. TIXIER-VIDAL.

15<sup>e</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Gif-sur-Yvette, France, septembre 1985, J. PUYMIRAT, J.N. LAVERRIERE, D. GOURDJI, F. DE VITRY, C. TOUGARD, C. LOUDES, A. TIXIER-VIDAL, A. FAIVRE-BAUMAN.

Réunion sur la maladie d'Alzheimer, Paris, 1985. J. PUYMIRAT.

NATO Advanced Workshop « GH Pituitary Cell Strains as Tools in Molecular and Cellular Biology », Fondation Royaumont, France, 4-8 novembre 1985. A. TIXIER-VIDAL, D. GOURDJI, C. TOUGARD, N. BRUNET DE CARVALHO, A. MORIN, J.N. LAVERRIERE.

Réunion I.N.S.E.R.M.-C.N.R.S. « Interactions entre Cellules Gliales et Neurones en Culture », Strasbourg, France, décembre 1985. A. FAIVRE-BAUMAN, J. PUYMIRAT, F. DE VITRY. Participations aux « Journées de l'Institut de Biologie » du Collège de France, Paris, 1984-1985.

Colloque de Pompadour, « Structure et Expression du Génome, Oncogènes ». 3-6 février 1986, A. TIXIER-VIDAL, D. GOURJI, J.N. LAVERRIERE.

XVII<sup>e</sup> Rencontre de Méribel, mars 1986, Les Arcs, F. DE VITRY.

Second Colloque National des Neurosciences, avril 1986, Bordeaux, France, A. TIXIER-VIDAL, F. DE VITRY, A. FAIVRE-BAUMAN, C. LOUDES.

68<sup>e</sup> Congrès de l'Association des Anatomistes. Toulouse, France, 28-30 mai 1986, A. TIXIER-VIDAL.

#### ORGANISATION DE CONGRÈS

Nato Advanced Research Workshop « GH Pituitary Cell Strains as Tools in Molecular and Cellular Biology », Fondation Royaumont, 4-8 novembre 1985. A. TIXIER-VIDAL and A.H. TASHJIAN Jr.

#### COURS ET SÉMINAIRES

Exposé dans le cadre du « Cours sur les techniques de l'immunofluorescence et les réactions immunoenzymatiques », Institut Pasteur, 8 juin 1985, C. TOUGARD.

Exposé dans le cadre du « Cours de cryoultramicrotomie » du C.N.R.S.-Formation, Marseille Luminy, novembre 1985, C. TOUGARD.

Séminaire dans le laboratoire du professeur PILGRIM, Ulm, R.F.A., 1985, J. PUYMIRAT.

Séminaire dans le laboratoire du professeur DUSSAULT, Université Laval, Québec, 1985, J. PUYMIRAT.

Séminaire dans le laboratoire du Professeur RAPPAPORT, Hôpital Necker, 1985, J. PUYMIRAT.

Exposé dans le cadre de l'Enseignement du Certificat de Cytologie et Histologie Générale, Faculté de Médecine, rue des Saints-Pères (Professeur J.P. DADOUNE), 9 janvier 1986, C. TOUGARD.

D.E.A. d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire, mai 1986, cours, A. TIXIER-VIDAL.

Séminaire méthodologique sur « les Techniques d'Immunocytochimie » et direction du séminaire bibliographique d'un étudiant - Aspects Moléculaires, Cellulaires et Métaboliques », C.H.U. Bicêtre, 29 mai 1986. C. TOUGARD. Séminaire méthodologique sur les cultures cellulaires, D. GOURDJI.

Séminaire à l'Unité I.N.S.E.R.M. 55, Hôpital Saint-Antoine, D' ROSSELIN, mai 1986, A. FAIVRE-BAUMAN.

Module de Neurobiologie et d'Endocrinologie, Maîtrise de Biochimie de Paris VI (12 heures de cours, avril-mai 1986), D. GOURDJI.

D.E.A. de Neurosciences. Module Biologie du développement du système nerveux. Paris VI, 1986, F. DE VITRY.

#### THÈSE

J. PUYMIRAT. Thèse de Doctorat ès Sciences, 26 février 1986 (nouvelle thèse) « Influence de la triiodothyronine sur le développement des neurones dopaminergiques de l'hypothalamus de souris : étude in vitro dans des cultures en milieu sans sérum ».