

Physiologie cellulaire

M. François MOREL, professeur

Sous le titre « l'inositol trisphosphate et le calcium, régulateurs intracellulaires », le cours de physiologie cellulaire a porté, cette année, sur un sujet qui connaît actuellement un développement explosif. Deux découvertes principales ont contribué à ouvrir cette nouvelle voie de recherche et à permettre son extension rapide aux domaines les plus divers de l'endocrinologie et de la biologie cellulaire.

La première, de nature fondamentale, due principalement aux travaux de Irvine et de Berrige, devait établir les mécanismes biochimiques par lesquels certains signaux et stimuli externes mobilisent du calcium dans leurs cellules-cibles. La deuxième, de nature plus méthodologique, due principalement aux travaux de Tsien, devait permettre de mesurer dorénavant de façon relativement simple (par une technique de fluorescence), la concentration du calcium ionisé dans le cytoplasme de cellules vivantes, et donc de mettre en évidence et d'étudier la réponse induite sur ce « deuxième messager » par les signaux et stimuli externes mentionnés ci-dessus.

Dans la première partie du cours, le métabolisme des phosphoinositides membranaires a été résumé, ainsi que le rôle majeur joué par la phospholipase C dans la libération de l'inositol trisphosphate (IP_3), d'une part, et de diacylglycerol, d'autre part, le premier conduisant au relargage de calcium par le reticulum endoplasmique, le second activant la protéine kinase C (en présence de Calcium). Puis, pour illustrer l'importance de ce nouveau mécanisme d'action de certaines hormones, il a été mentionné qu'une action comme celle du glucagon sur la cellule hépatique — dont Sutherland et Rall avaient démontré dès 1958 qu'elle implique l'AMP cyclique comme deuxième messager — pourrait bien, en réalité (au moins pour les concentrations physiologiques d'hormone), passer plutôt par la voie de l'inositol trisphosphate et du calcium, selon les résultats tout récents de Wakelam et al (*Nature*, 323, p. 68-71, septembre 1986). Ces auteurs ont montré, en effet, que le K_a apparent du glucagon pour stimuler la production d' IP_3 dans les hépatocytes

(0.25 nM), est plus bas que celui pour la production endogène de cAMP (1.2 nM), ou pour l'activation de l'adénylate cyclase (6.3 nM).

Après avoir ainsi souligné l'actualité et l'importance de cette nouvelle voie régulatrice du fonctionnement cellulaire, l'étendue de son champ d'application a été montrée grâce à l'énumération d'un certain nombre d'actions hormonales variées pour lesquelles il a été établi que l'IP₃ est impliqué.

*

**

Un chapitre important du cours a ensuite porté sur la discussion critique des méthodes disponibles qui permettent de mesurer la concentration intracellulaire du calcium ionisé.

On sait que le calcium ionisé libre du cytoplasme ne représente qu'une fraction très faible du calcium cellulaire total, car la plus grande partie du calcium est soit séquestrée dans certains organelles intracellulaires (reticulum endoplasmique, mitochondries), soit liée à des macromolécules membranaires, ou à diverses espèces protéiques. La mesure de la concentration du calcium ionisé libre, comprise entre 10^{-8} et 10^{-6} molaire, exige donc des méthodes tout à la fois hautement sensibles et sélectives ; il en existe trois principales, à savoir, les microélectrodes sélectives au calcium, la bioluminescence de certaines protéines activées par le calcium (dont l'aequorine est le prototype), la fluorescence de certains colorants organiques liant le calcium (dont le Quin 2 est le prototype). Les performances et limites propres à ces différentes techniques ont été discutées en détail. Rappelons que les microélectrodes sélectives au calcium sont peu utilisées malgré leur précision, parce que leur sensibilité devient insuffisante en-dessous de $1 \mu\text{M}$, c'est-à-dire dans le domaine des concentrations de calcium qui prévalent habituellement dans la cellule. En ce qui concerne l'aequorine, c'est un excellent indicateur, mais son utilisation est limitée en raison du fait qu'elle doit être introduite dans la cellule à l'aide de micropipettes. Par contre, ces deux types d'inconvénients n'existent plus dans le cas des nouvelles séries de colorants tétracarboxyliques dérivés du BAPTA mis au point par Tsien à partir de 1980 et qui ont conduit successivement à la synthèse du Quin 2, puis du Fura 2. Ces composés fluorescents lient le calcium avec une stoechiométrie de 1 pour 1 et une bonne affinité (K_D de l'ordre de 10^{-7} molaire, selon les conditions et les composés). La liaison de coordination d'un ion calcium sur la molécule affectant l'intensité de la fluorescence, on conçoit que ces molécules puissent être utilisées comme sondes fluorescentes pour mesurer le calcium ionisé intracellulaire, et ceci d'autant mieux que le Quin 2, comme le Fura 2, ont une excellente sélectivité pour l'ion Ca^{2+} par rapport aux principaux autres cations intracellulaires, y compris le Mg^{2+} . Pour assurer la pénétration de la sonde fluorescente dans la cellule, on utilise des dérivés dont les fonctions carboxyliques sont esterifiées par des restes hydrophobes ; ces dérivés traversent facilement les

membranes cellulaires et sont ensuite hydrolysés dans le cytoplasme par diverses estérases, de sorte que la sonde (hydrosoluble) est régénérée dans la cellule où elle s'accumule.

Mentionnons que, par rapport au Quin 2, le Fura 2, dont la synthèse a été décrite par Tsien et al en 1985 (*J. Biol. Chem.* 260, p. 3440-3450), présente les avantages suivants : 1) un rendement quantique de fluorescence environ 30 fois meilleur permet de l'utiliser à des concentrations moindres dans la cellule, ce qui réduit d'autant l'effet « tampon calcium » exercé par le colorant ; 2) un déplacement marqué du spectre d'excitation de fluorescence vers les courtes longueurs d'onde en présence de calcium permet, en utilisant le rapport des fluorescences mesurées pour deux longueurs d'onde d'excitation (335 et 380 nm) de calculer la concentration du calcium libre dans la cellule indépendamment de la quantité de sonde fluorescente présente et de ses variations ; enfin, 3) le K_D de liaison du calcium est plus élevé pour le Fura 2 que pour le Quin 2, ce qui améliore la précision du dosage aux concentrations habituellement rencontrées dans la cellule. Malgré tous ces avantages, l'utilisation systématique du Fura 2, comme celle du Quin 2, n'est pas sans poser un certain nombre de problèmes méthodologiques et pratiques. Ceux-ci ont été longuement discutés au cours grâce à l'analyse critique de divers travaux, publiés dans les deux dernières années, et qui font apparaître des contradictions manifestes aussi bien qualitatives que quantitatives, dans les résultats obtenus ou leur interprétation. Au nombre de ces problèmes, citons :

— Les effets toxiques des produits d'hydrolyse des acétométhylesters de Fura 2 ou Quin 2 dans certaines cellules.

— La pénétration, parfois difficile à exclure, de la sonde fluorescente dans certains compartiments cellulaires riches en calcium (réticulum, mitochondries) ou sa diffusion hors de la cellule dans le milieu externe (également riche en calcium).

— La difficulté de réaliser, en pratique, une calibration correcte des fluorescences maximale et minimale (mesurées pour des concentrations de calcium respectivement saturante et nulle), nécessaires à connaître pour calculer les concentrations de calcium intracellulaire.

— L'incertitude qui subsiste toujours sur la valeur exacte du K_D de liaison du calcium sur la sonde fluorescente dans les conditions qui prévalent au sein du cytoplasme cellulaire (force ionique, viscosité, ions métalliques, etc.).

Ces causes d'erreur expliquent sans doute la variabilité considérable observée dans les valeurs numériques obtenues pour la concentration calcique selon les auteurs et les conditions, et imposent la prudence : la méthode, telle qu'elle est employée aujourd'hui, n'autorise pas le calcul de valeurs absolues pour $[Ca]^{2+}$; par contre, elle est très sensible et performante pour mesurer des concentrations relatives et leurs variations éventuelles en fonction du temps.

En principe, elle permet aussi l'analyse de la distribution spatiale de la concentration du calcium dans la cellule (compartimentation du calcium ionisé) et de ses variations temporelles, en associant à l'emploi de la microscopie de fluorescence du Fura 2 l'utilisation d'une caméra de très haute sensibilité couplée à un analyseur d'image digitalisée donnant la concentration du calcium point par point. L'étude de la « compartimentation » du calcium libre intracytoplasmique et de ses variations au cours de la division cellulaire a été conduite sur des cellules épithéliales en culture par plusieurs équipes indépendantes utilisant ce type de méthode de haute résolution. Là encore, des divergences notables, qualitatives et quantitatives, apparaissent dans les résultats : Poenie et al. (*Science*, 233, 886-889, 1986) notent une montée brusque et transitoire (20 sec) de la concentration du calcium libre lors de la transition métaphase anaphase sans gradient intracellulaire évident lors du pic d'augmentation. Pour Ratan et al. (*Proc. Nat. Acad. Sciences*, 83, 5136-5140, 1986), au contraire, c'est au cours de l'anaphase que l'on note une augmentation du calcium libre ; de plus, celle-ci est principalement localisée au niveau des pôles fusoriaux par rapport aux autres régions du cytoplasme.

Malgré les incertitudes dont elle est encore entachée et qui justifiaient pour cela une discussion approfondie, la méthode fluorométrique de mesure du calcium par le Quin 2 et surtout le Fura 2 représente une avancée décisive et prometteuse, car elle ouvre enfin à l'analyse expérimentale directe et *in vivo* un paramètre régulateur du fonctionnement cellulaire dont on soupçonnait certes le rôle, mais sans pouvoir l'étudier.

*

**

Le chapitre suivant du cours a été consacré aux protéines liant le calcium. Leur rôle physiologique est essentiel, puisque c'est toujours en se liant sélectivement à des effecteurs spécifiques que le calcium peut exercer dans la cellule un rôle régulateur. Outre certains phospholipides des membranes cellulaires, les effecteurs spécifiques auxquels l'ion calcium est susceptible de se lier sont en général des protéines. Quelques-unes d'entre elles peuvent être directement responsables des effets produits par le calcium, en ce sens que leur molécule comporte à la fois un site de liaison du calcium et un site responsable d'une fonction biochimique ou physiologique donnée : dès lors, la liaison du calcium peut induire un changement de conformation de la protéine et modifier par là sa fonction. Il semble établi que la protéine kinase C, ou encore certains canaux à potassium, soient activés par le calcium en le liant directement. Pour la plupart des enzymes et effecteurs dont l'activité est modulée par le calcium, cette action régulatrice est indirecte : le calcium se lie à des protéines spécifiques (« calcium binding proteins »), et le changement de conformation qui en résulte confère à ces protéines une affinité accrue pour les diverses enzymes dont elles contrôlent à leur tour l'activité en interagissant

avec elles. La calmoduline est la mieux connue des protéines cytosoliques liant le calcium qui exerce ce type de régulation sur diverses protéines enzymatiques.

L'affinité élevée et la grande spécificité avec lesquelles le calcium est susceptible de se lier réversiblement à certaines protéines résultent du fait que ces protéines comportent (en général en plusieurs régions de leur molécule) une conformation tridimensionnelle particulière qui permet la formation de liaisons de coordination entre plusieurs oxygènes carbonyles ou carboxyles et un atome de calcium.

Une telle structure, comportant deux segments d' α hélice séparées par une boucle (β turn), a été décrite d'abord par Kretzinger en 1981 sous le nom de EF-Hand par analyse cristallographique aux rayons X d'une protéine acide extraite du muscle squelettique, la parvalbumine. L'ion calcium contracte des liaisons de coordination avec des atomes d'oxygène de la chaîne peptidique (glutamates et aspartates principalement) et un oxygène de l'eau, l'ensemble formant un octaèdre distordu.

Des séquences d'EF-Hand similaires ont été retrouvées dans la molécule d'autres protéines liant le calcium, dont la troponine C, l'aequorine et la calmoduline sont des exemples importants. Rappelons que la calmoduline est une protéine soluble, acide, dont la molécule (poids moléculaire 16 600) comporte 4 domaines de type EF-Hand possédant une affinité différente et assez faible pour le calcium (K_D compris entre 4 et 18 μM). Le changement de conformation de la calmoduline résultant de la liaison de calcium augmente l'hydrophobicité de surface de la molécule et lui permet de se lier avec une grande affinité à diverses enzymes régulatrices. Malgré une constante de liaison pour le calcium élevée par rapport à la concentration du calcium dans le cytosol (qui est de l'ordre de 0,1 μM), la calmoduline peut jouer un rôle régulateur parce qu'elle est très abondante dans beaucoup de types de cellules (sa concentration y dépasse souvent 10 μM) : quelques pour cent de la calmoduline complexés à du calcium suffisent probablement pour activer totalement dans la cellule certaines enzymes calmoduline-dépendantes.

Parmi les enzymes dont l'activité est modulée par la calmoduline, citons : la phosphorylase β kinase, la glycogène synthétase, différentes protéines kinases, la calcium ATPase, la phospholipase A_2 , etc. Mais bien d'autres protéines (dont les fonctions propres n'ont pas encore été établies) sont capables de lier spécifiquement le complexe calmoduline-calcium, comme le révèlent les nombreuses bandes d'électrophorèse qui lient le complexe calmoduline-Ca, mais non la calmoduline libre, lorsque les gels sont superfusés avec de la calmoduline marquée par l'iode 125.

*

**

En dehors de ce groupe principal de protéines liant le calcium dont la molécule comporte la structure « EF-Hand », d'autres protéines liant le calcium ont été récemment mises en évidence et analysées. Ces protéines seraient impliquées dans le mécanisme d'exocytose (un processus calcium-dépendant). Malgré des poids moléculaires différents et une distribution tissulaire très variable, ces protéines possèdent en commun une « séquence consensus » comparable à celle décrite dans la calélectrine de Torpedo et qui n'a d'homologie qu'avec 3 séquences voisines décrites récemment dans la molécule de la lipocortine. La séquence consensus en question associe une α -hélice et une boucle adjacente, le tout comportant plusieurs résidus polaires (dont des résidus carboxyliques aspartates et glutamates) en positions bien déterminées. Il n'a pas encore été établi si cette séquence particulière correspondait effectivement au site de liaison du calcium sur ces protéines.

Tout récemment, enfin, Stuart et al. (*Nature*, 324, p. 84-89, novembre 1986) ont identifié et analysé par cristallographie de rayons X dans la molécule de la β lactalbumine une nouvelle boucle de fixation du calcium en forme d'« Elbow », très différente de l'EF-Hand, et qui se présente comme une double pyramide pentagonale assurant une coordination presque idéale du calcium, avec des atomes d'oxygène carbonyles aux 2 apex, tandis que 3 oxygènes carboxylates et 2 oxygènes de l'eau forment les 5 sommets du pentagone (dans le plan basal de la pyramide). Toutes les distances entre atome de calcium et atome d'oxygène sont comprises entre 2.3 et 2.5 Å. Curieusement, c'est avec le seul lysozyme (et nullement avec la parvalbumine par exemple) que la β -lactalbumine présente un degré d'homologie élevé et une conformation spatiale identique de cette portion de la chaîne peptidique, même si le lysozyme de la majorité des espèces étudiées (à l'exception de celui du cheval) ne possèdent pas dans leur « Elbow » les oxygènes carbonyles et carboxyliques requis pour permettre la fixation du calcium.

*

**

En conclusion, nous sommes encore loin de connaître avec précision les mécanismes par lesquels le calcium assure dans la cellule de nombreux effets régulateurs. Comme dans le cas des régulations exercées par l'intermédiaire de l'AMP cyclique, les premières étapes de la cascade régulatrice, celles qui couplent la formation du complexe hormone-récepteur à la production du deuxième messager intracellulaire (calcium ou cAMP), sont bien mieux établies que les dernières étapes de la cascade, celles par lesquelles le calcium (ou le cAMP) contrôlent les effecteurs moléculaires responsables de la réponse biologique.

Dans le cours de l'année prochaine, nous nous proposons de poursuivre l'étude de ce problème en discutant, d'une part, les mécanismes membranaires

(canaux à calcium, calcium ATPase) qui contribuent à assurer l'homéostasie calcique intracellulaire, d'autre part, le rôle du diacylglycerol et de la protéine kinase C dans la genèse de la réponse cellulaire aux agonistes activant la phospholipase C.

F.M.

PROGRAMME DES SÉMINAIRES

14 novembre : C. LE PEUCH : La Calmoduline dans la régulation de la contraction musculaire.

21 novembre : J.P. MAUGER : Régulation hormonale des mouvements de calcium dans les hépatocytes.

28 novembre : F. PECKER : La pompe à calcium des membranes plasmiques.

5 décembre : A. ENJALBERT : Mécanismes d'action des neurohormones dans la sécrétion de Prolactine.

12 décembre : J. BOCKAERT : Les G Protéines de Transduction.

9 janvier : E. MILGROM : Données récentes sur les mécanismes d'action de la progestérone.

16 janvier : P. CORVOL : Du gène aux inhibiteurs de la Rénine.

23 janvier : M. BEGEOT : Interrelations entre l'ACTH et l'Angiotensine dans la régulation des fonctions surrénaliennes.

30 janvier : J.N. LAVERRIÈRE : Mécanismes de transduction et régulation du gène de la Prolactine.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Parmi les travaux de recherche poursuivis dans le laboratoire de Physiologie cellulaire, nous insisterons plus particulièrement, dans le rapport d'activité de cette année, sur certains aspects qui concernent la régulation du fonctionnement des cellules rénales.

I. MODULATION INHIBITRICE DE L'ACTIVITÉ ADÉNYLATE CYCLASIQUE TUBULAIRE

(D. CHABARDÈS et M. MONTÉGUT)

L'utilisation systématique d'une microméthode radioimmunologique permettant le dosage des nucléotides cycliques contenus dans des segments uniques de néphron, précédemment mise au point dans le laboratoire, avait permis de montrer qu'il existe dans le tubule collecteur du rat des récepteurs α_2

adrénergiques négativement couplés à l'adénylate-cyclase sensible à l'hormone antidiurétique, puisque la noradrénaline (10^{-8} à 10^{-7} M) ajoutée à des tubules en survie *in vitro* inhibe de 80 p. 100 en moyenne l'accumulation endogène de cAMP induite en 4 minutes par la vasopressine (en présence d'un inhibiteur de la phosphodiesterase).

Ces premières observations ont été confirmées et surtout approfondies et étendues depuis, révélant une modulation négative de l'adénylate cyclase par les agonistes α_2 adrénergiques ou la PGE_2 qui varie selon les segments du néphron et les espèces animales.

Ainsi, chez le lapin, la réponse du tubule collecteur à la vasopressine n'est pas inhibée par la noradrénaline (contrairement au rat), alors que la PGE_2 , au contraire, l'inhibe de plus de 60 % (la PGE_2 est sans effet sur le tubule collecteur du rat).

Par contre, si on analyse les réponses hormonales de l'enzyme contenue dans la branche large ascendante (CAL), on observe une situation inverse : chez le rat, les réponses du CAL sont inhibées de plus de 50 % par la PGE_2 , mais non les agonistes α_2 adrénergiques. L'inhibition produite par le PGE_2 ($3 \cdot 10^{-7}$ M) s'exerce vis-à-vis des cinq hormones stimulant l'adénylate cyclase du CAL chez le rat, à savoir : la vasopressine, le glucagon, la calcitonine, l'hormone parathyroïdienne et les agonistes β adrénergiques. Ce résultat est en accord avec une observation antérieure du laboratoire, démontrant que les récepteurs spécifiques à toutes ces hormones dans le CAL du rat sont tous couplés à un pool unique d'adénylate cyclase, puisque les effets maximum produits par ces 5 hormones ne sont aucunement additifs. Ceci est également en accord avec l'homogénéité cellulaire de ce segment du néphron.

Dans le canal collecteur, par contre, existent deux types cellulaires distincts, les cellules principales et les cellules intercalaires, dont les premières contiendraient l'adénylate cyclase sensible à la vasopressine et les secondes l'enzyme sensible aux agonistes β adrénergiques. Le fait que, chez le rat, la noradrénaline (récepteur α_2) inhibe seulement la réponse à la vasopressine sur ce segment, tandis que la PGE_2 inhibe seulement celle aux agonistes β adrénergiques, confirme l'hypothèse que les deux agonistes stimulent bien la cyclase contenue dans des types cellulaires différents.

II. CONTRÔLE DE LA $Na^+-K^+-ATPase$ DU SEGMENT MEDULLAIRE DE LA BRANCHE LARGE ASCENDANTE (MAL) PAR LES GLUCOCORTICOÏDES

(A. DOUCET, A. HUS-CITHAREL)

Dans un travail précédent du laboratoire, il avait été montré que l'administration de dexaméthasone au lapin surrénalectomisé restaure en moins de 3

heures l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ du MAL, sans augmenter le nombre apparent de sites catalytiques (tel qu'on peut le mesurer par liaison spécifique de la [^3H]-ouabaine).

Afin de pouvoir analyser le mécanisme cellulaire de cette réponse, il fallait parvenir à la produire sur des tubules en survie *in vitro*. A cette fin, des segments médullaires d'anse large (MAL) ont été disséqués sur des reins de rats surrénalectomisés, puis ont été incubés à 37 °C dans un μl de milieu complet, en présence ou non de 10^{-8} M de dexaméthasone. L'activité Na-K-ATPase a été mesurée après une durée d'incubation variable. En l'absence de dexaméthasone, l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ demeure constante pendant ou moins trois heures. En présence de l'hormone, l'activité de l'enzyme augmente après une latence de 30 minutes et atteint un plateau en 1 heure environ. Le glucocorticoïde agit donc directement sur le tubule et son effet peut être induit *in vitro*.

La stimulation de la Na-K-ATPase par la dexaméthasone est dose-dépendante (K_A apparent, 10^{-9} M environ). L'effet de l'hormone est supprimé en présence de cycloheximide (20 μM) ou d'actinomycine D (5 μM), ce qui démontre qu'une synthèse protéique est impliquée dans le processus.

Pour déterminer si une augmentation du transport actif de sodium par les cellules intactes correspond à cette stimulation de l'activité maximale de l'enzyme, il a été recherché si la dexaméthasone stimule le métabolisme énergétique lié au transport de sodium sur des tubules en survie *in vitro*. Le métabolisme énergétique couplé au transport de sodium a été déterminé en mesurant la fraction ouabaine-dépendante du $^{14}\text{CO}_2$ métabolique formé à partir de glucose uniformément marqué par le ^{14}C . Les résultats indiquent qu'après une latence d'une heure environ, la production de CO_2 est stimulée lorsque les échantillons sont incubés en présence de dexaméthasone (10^{-8} M). L'augmentation porte uniquement sur la fraction du métabolisme qui est sensible à l'ouabaine.

Des arguments pharmacologiques suggèrent que l'action de la dexaméthasone pourrait faire intervenir la synthèse de lipocortine et son action inhibitrice sur la phospholipase A_2 et le métabolisme de l'arachidonate.

III. CONTRÔLE DE LA $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ DU SEGMENT MÉDULLAIRE DE LA BRANCHE LARGE (MAL) PAR LE *cAMP*

(A. DOUCET)

Ajouté en faible dose au milieu d'incubation de MAL de rat en survie *in vitro*, la calcitonine comme la vasopressine provoquent, en quelques minutes, une inhibition importante (40 %) de l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Cette réponse est également obtenue avec la forskoline ou le dBcAMP. L'addition

d'arachidonate produit un effet équivalent ; enfin, la mépacrine, un inhibiteur de la phospholipase A_2 , abolit l'action de la vasopressine mais pas celle de l'arachidonate, tandis que les inhibiteurs de la monooxygénase suppriment aussi bien l'inhibition produite par l'arachidonate que celle produite par la vasopressine. On en déduit que l'activité de la Na^+-K^+ -ATPase est sous la dépendance d'un dérivé métabolique de l'acide arachidonique passant par la voie de la monooxygénase, et que la vasopressine (via la production de cAMP) lève l'inhibition exercée par la lipocortine sur l'activité de la phospholipase A_2 .

IV. MISE EN ÉVIDENCE ET ÉTUDE D'UNE POTASSIUM-ATPase LE LONG DU NÉPHRON

(A. DOUCET, S. MARSY, M. IMBERT-TEBOUL)

On sait qu'il existe, dans les cellules intercalaires de la muqueuse gastrique, une ATPase de transport particulière, la K-H-ATPase, qui est impliquée dans la sécrétion acide de l'estomac.

Comme certains segments du néphron contiennent des « cellules sombres » (cellules intercalaires) et sont le siège de processus d'acidification de l'urine, il était justifié de rechercher si ces segments ne contiendraient pas également cette K-H-ATPase. En utilisant une microméthode appliquée à des segments uniques de néphron obtenus par microdissection et des conditions dans lesquelles les autres activités ATPasiques connues sont bloquées, il a été en effet possible, sur certains segments tubulaires, de mettre en évidence une activité ATPasique sensible au potassium avec une affinité apparente de 0.3 mM. Cette activité est insensible à l'ouabaïne, elle est inhibée par le vanadate et surtout elle est inhibée avec un K_1K_i de 15 μ M par l'oméprazole (qui est un inhibiteur spécifique de la K-H-ATPase gastrique).

Cette activité K^+-H^+ -ATPasique est présente exclusivement dans les segments « connecteur » et « collecteur » du néphron, à l'exclusion de tous les autres. Elle se trouve donc dans les segments qui contiennent des cellules intercalaires.

Afin d'établir si cette enzyme est bien impliquée dans la réabsorption du potassium, il a été recherché si son activité était assujettie à une adaptation physiologique chez des rats soumis à un régime déplété en potassium. Les résultats de ces expériences montrent que, dans les 3 jours qui suivent l'instauration de la carence alimentaire en potassium, l'activité K-ATPasique du tubule collecteur cortical et médullaire est fortement stimulée (100 %), au moment où s'installe une réabsorption presque totale du potassium contenu dans le fluide tubulaire.

V. MESURE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE ET ÉTUDE DE SA RÉGULATION

(J. MARCHETTI et F. MOREL)

On sait l'importance croissante qui est accordée au calcium ionisé intracytoplasmique comme facteur de régulation de nombreux processus et fonctions cellulaires et comme 2^e messager de l'action de diverses hormones. On sait, d'autre part, que des molécules fluorochromes chélatrices du calcium ont été mises au point par TSIEN dans les dernières années, qui permettent de mesurer par fluorescence la concentration intracellulaire du calcium ionisé. L'utilisation de ces indicateurs fluorescents connaît un grand développement, et nous avons consacré un effort important à appliquer cette méthodologie nouvelle à l'échelle de segments uniques de tubules rénaux. Les principales difficultés expérimentales rencontrées en cours de route sont aujourd'hui surmontées et la méthode a pu être automatisée grâce à la construction d'un passeur automatique pour les 2 filtres d'excitation (à 336 et 384 nm) du Fura 2.

La méthode permet de mesurer en épifluorescence au microscope et de façon continue, 10 fois par minute à chacune des longueurs d'onde, l'intensité de fluorescence émise (au travers d'une fenêtre réglable) par un fragment de tubule chargé au préalable par du Fura 2. Le dispositif permet de maintenir la température constante et de superfuser continuellement le tubule, au débit de 0.4 ml par minute, par des solutions de composition connue et choisie. Les résultats sont digitalisés et enregistrés. L'autofluorescence des tubules ainsi que le bruit de fond hors des tubules sont en général faibles par rapport au signal mesuré. Certains segments, comme les tubules collecteurs, ne relarguent que très lentement leur Fura 2 dans le milieu et peuvent être étudiés pendant 2 heures. D'autres, le CAL et le MAL, le perdent plus rapidement.

L'analyse des mécanismes qui assurent, dans les membranes cellulaires, les échanges de calcium entre cytoplasme et milieux extracellulaires est en cours actuellement, et des différences manifestes ont déjà été relevées entre les principaux segments du néphron.

PUBLICATIONS

A. HUS-CITHAREL and F. MOREL. *Coupling of metabolic CO₂ production to ion transport in isolated rat thick ascending limb and collecting tubule* (Pflügers Arch., 407, 421-427, 1986).

D. BUTLEN, D. CHABARDES and F. MOREL. *Atrial natriuretic peptide receptors along the rat and rabbit nephron : Comparison of hormonal binding and cyclic GMP production in microdissected glomeruli and tubules* (XIth European

Symposium on Hormones and Cell Regulation. Mt. Ste Odile, France, September 29-October 2, 1986, Abstr.).

K. AIT-MOHAMED, S. MARSY, C. BARLET, C. KHADOURI and A. DOUCET. *Characterization of N-Ethylmaleimide-sensitive proton pump in the rat kidney. (J. Biol., Chem. 261, 12526-12533, 1986).*

C. BARLET and A. DOUCET. *Kinetics of triiodothyronine action on Na-K-ATPase in single segments of rabbit nephron (Pflügers Arch., 407, 27-32, 1986).*

C. BARLET and A. DOUCET. *Lack of stimulation of Na-K-ATPase in long term thyroidectomized rabbits (Pflügers Arch., 407, 428-431, 1986).*

A. DOUCET, A. HUS-CITHAREL and F. MOREL. *In vitro stimulation of Na-K-ATPase in rat thick ascending limb by dexamethasone (Am. J. Physiol., 251 ; Renal Fluid Electrolyte Physiol. 20 ; F 851-F857, 1986).*

F. MOREL, M. IMBERT-TEBOUL and D. CHABARDES. *Arginine vasopressin and other hormone receptors in the mammalian kidney (Kidney Int., 31, 512-520, 1987).*

C. BARLET and A. DOUCET. *Interaction between triiodothyronine and aldosterone in control of Kidney Na-K-ATPase in the mammalian collecting tubule. In : Molec. Nephrol., Biochemical Aspects of Kidney Function. Z. KOVACEVIC and W.C. GUDER Eds. de GRUYTER, Berlin, pp. 63-69, 1987).*

J. MARCHETTI, F. PRADDAUDE, S. ROSEAU and F. MOREL. *Relation between the renal Angiotensin I converting enzyme (CE) and the inactivation of kinins by the kidney. (In : Molec. Nephrol., Biochemical Aspects of Kidney Function. Z. KOVACEVIC and W.G. GUDER, Eds. de Gruyter, Berlin, pp. 385-390, 1987).*

D. BUTLEN, D. CHABARDES and F. MOREL. *Atrial natriuretic peptide (ANP) receptors along the nephron. (The Amer. Soc. of Nephrology. 19th Annual Meeting, Washington, December 7-10, 1986 ; Kidney Int., 31, 262, 1987, Abstr.).*

R. RAJERISON, M. FAURE and F. MOREL. *Volume regulation of isolated rat medullary thick ascending limbs of Henle's loop (MAL) in isotonic media. (The Amer. Soc. of Nephrology, 19th Annual Meeting, Washington, December 7-10, 1986 ; Kidney Int., 31, 440, 1987, Abstr.).*

A. DOUCET, C. BARLET and C. KHADOURI. *Effect of water intake on Na-K-ATPase in nephron segments of the desert rodent, *jaculus orientalis* (Pflügers Arch., 408, 129-132, 1987).*

J. MARCHETTI, S. ROSEAU and F. ALHENC-GELAS. *Distribution of Angiotensin I converting enzyme and kinin-hydrolyzing enzymes along the microdissected rabbit nephron (Kidney Int., 31, 744-751, 1987).*

D. BUTLEN, M. MISTAOUI and F. MOREL. *Atrial natriuretic peptide receptors along the rat and rabbit nephrons : [¹²⁵I] α -rat atrial natriuretic peptide binding in microdissected glomeruli and tubules (Pflügers Arch., 408, 356-365, 1987).*

D. CHABARDES, M. MONTÉGUT, M. MISTAOUÏ, D. BUTLEN and F. MOREL. *Atrial natriuretic peptide effects on cGMP and cAMP contents in microdissected glomeruli and segments of the rat and rabbit nephron (Pflügers Arch., 408, 366-372, 1987).*

C. BARLET and A. DOUCET. *Triiodothyronine enhances renal response to aldosterone in the rabbit collecting tubule (J. Clin. Invest., 79, 629-631, 1987).*

Kh. BADDOURI, M. EL HILALI, J. MARCHETTI and J. MENARD. *Renal excretion capacity in hydrated desert rodents (J. Comp. Physiol. D 157, 237-240, 1987).*

CONFÉRENCES, CONGRÈS ET MISSIONS

M. A. DOUCET a présenté un exposé sur invitation au 30^e Congrès International de Physiologie (Vancouver, juillet 1986).

M. F. MOREL a donné la Conférence Inaugurale du 1^{er} Colloque National Marocain d'Endocrinologie Comparée (Fès, septembre 1986) ; il a été l'un des organisateurs du 11^e Symposium Européen « Hormones and Cell Regulation » (Mont Sainte-Odile, septembre 1986) et du 8^e Symposium International « Biochemical Aspects of Kidney Function » (Dubrovnik, octobre 1986), auquel J. MARCHETTI et C. BARLET ont présenté des communications. F. MOREL a donné une Conférence à l'occasion du Dies Academicus (Lausanne, octobre 1986).

D. BUTLEN et R. RAJERISON ont présenté des communications à la 19^e Réunion Annuelle de la Société Américaine de Néphrologie (Washington, décembre 1986).

DIPLÔMES ET PROMOTIONS

M^{me} C. BARLET-BAS a passé sa Thèse de Docteur ès Sciences.

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

Responsable : M^{me} A. TIXIER-VIDAL, Directeur de Recherche C.N.R.S.

RAPPORT D'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

Juin 1986 — Juin 1987

L'objectif des recherches réside dans une analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans les régulations neuroendocrines aux deux niveaux du complexe hypothalamo-antéhypophysaire. Dans ce but, des approches multidisciplinaires sont appliquées à des modèles de cellules en culture, qui ont été précédemment définis et caractérisés : lignées continues et cultures primaires de cellules antéhypophysaires d'une part, de cellules hypothalamiques d'autre part. Au sein de ce cadre général, deux grands thèmes de recherche sont développés parallèlement. Les résultats publiés au cours de l'année concernent ces deux thèmes.

*I. MÉCANISMES CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES DE LA SÉCRÉ-
TION DE LA PROLACTINE HYPOPHYSAIRE*

Dans le cadre de ses recherches sur la régulation des sites de liaison du neuropeptide TRH par les cellules de la lignée GH3/B6, Danielle GOURDJI (1986) a analysé l'interaction d'une benzodiazépine, la chlordiazepoxide (CDZ) sur la liaison et les effets biologiques du TRH. Elle a observé que le CDZ inhibe la liaison du ³H-TRH de façon dépendante de la dose (IC 50 : 10 μ M) et déplace le ³H-TRH lié. En ce qui concerne la réponse prolactinique, seules des doses pharmacologiques de CDZ (100 μ M) sont capables de bloquer la stimulation de la libération de prolactine et de la transcription du gène de la prolactine induite par des doses faibles (2 nM) de TRH. En outre, une étude pharmacologique portant sur une série de benzodiazépines et d'antagonistes sélectifs suggère que l'interaction CDZ-TRH ne met pas en jeu des récepteurs classiques (centraux ou périphériques) aux benzodiazépines et ne peut s'expliquer par une interaction de type compétitif simple. Par ailleurs, une étude *in vivo*, conduite en collaboration avec J.N. Hugues (1987), a montré que l'adaptation de la fonction thyrotrope du rat au jeûne n'était pas médiée par une modification, ni du nombre ni de l'affinité des sites de liaison du TRH par les membranes hypophysaires.

J.N. Laverrière a poursuivi, sous la direction de D. Gourdji, ses recherches sur les mécanismes de l'effet transcriptionnel du TRH sur le gène de la

prolactine dans les cellules GH₃/B₆. Il a émis l'hypothèse que les messagers intracellulaires impliqués dans l'effet rapide du TRH sur la libération de la prolactine seraient également responsables de l'effet transcriptionnel du TRH. On sait que l'occupation des sites TRH génère rapidement une augmentation de la concentration du Ca²⁺ cytosolique et une activation de la protéine kinase C (PKC). Il a donc testé les effets transcriptionnels d'agents actifs sur chacune de ces deux voies intracellulaires : ionophores calciques (A23187) et esters de phorbol (TPA). Les résultats préliminaires publiés permettent de ranger dans un ordre décroissant d'efficacité le TRH, le A23187, le TPA (1986). La mise en œuvre récente d'agonistes spécifiques des canaux calciques lents permettra de mieux préciser l'efficacité relative de ces composants de l'effet transcriptionnel du TRH. En outre, une étude conduite en vue de corrélérer le taux d'occupation des récepteurs du TRH et le taux de transcription du gène de la prolactine indique que l'occupation maintenue des récepteurs est nécessaire pour le maintien de l'effet transcriptionnel du TRH (1986).

En ce qui concerne les mécanismes cellulaires de la sécrétion antéhypophysaire, le groupe de C. Tougard a poursuivi ses recherches sur la localisation cellulaire et subcellulaire d'une glycoprotéine majoritaire des membranes basales antéhypophysaires : la laminine. E. Vila-Porcile (1987) en a élucidé la distribution cellulaire et subcellulaire dans les cellules antéhypophysaires par immunocytochimie ultrastructurale. La laminine est détectée dans les sites de transit intracellulaire des protéines sécrétoires : reticulum endoplasmique rugueux et citernes golgiennes. En outre, en fonction des types cellulaires, elle est également localisée dans des vacuoles ou vésicules (cellules à prolactine) ou même dans des grains de sécrétion (cellules gonadotropes). Ceci suggère que la laminine serait exportée par les cellules glandulaires antéhypophysaires et selon des voies différentes en relation avec la spécificité biochimique des cellules antéhypophysaires. Cette hypothèse est actuellement testée par N. De Carvalho sur des cultures primaires par marquage suivi de chasse et les premiers résultats indiquent que la laminine néosynthétisée est effectivement exportée dans le milieu. Parallèlement, N. De Carvalho recherche les effets biologiques de la laminine sur la forme et l'activité sécrétoire des cellules GH₃/B₆ cultivées en absence de sérum. C. Tougard poursuit ses recherches sur la régulation des compartiments membranaires impliqués dans le processus sécrétoire de la prolactine.

II. DÉVELOPPEMENT DES NEURONES HYPOTHALAMIQUES

Les résultats publiés s'inscrivent dans la poursuite des recherches conduites depuis plusieurs années, selon deux axes : 1. identification et mode d'action de facteurs épigénétiques humoraux actifs sur la différenciation biochimique et fonctionnelle de neurones hypothalamiques, 2. ontogénèse de propriétés spéci-

fiques des neurones hypothalamiques sérotoninergiques, dopaminergiques et à thyrolibérine.

Un effet autoamplificateur de la sérotonine sur les neurones hypothalamiques sérotoninergiques a été mis en évidence par F. De Vitry, en collaboration avec le groupe de M. Hamon dans des cultures primaires de cellules hypothalamiques. Les cellules embryonnaires d'hypothalamus de souris prélevées à un stade précoce sont capables de synthétiser en culture la sérotonine à partir du 5-HTP (activité 5-HTP décarboxylase) et de capter la ^3H -sérotonine ; par contre, à la différence des neurones sérotoninergiques du tronc cérébral, elles ne possèdent pas d'activité tryptophane hydroxylase. Le traitement précoce et répété des cultures par un agoniste sérotoninergique augmente le nombre des neurones sérotoninergiques et l'activité de la tryptophane décarboxylase. Cet effet est strictement spécifique de la sérotonine et des neurones sérotoninergiques, ce qui suggère un mécanisme autocrine (De Vitry et al., 1986). Par ailleurs, l'expression de propriétés sérotoninergiques a pu être induite dans la lignée hypothalamique primitive pluripotente F7, obtenue initialement par transformation par le SV 40. Cultivée dans des conditions appropriées, ces cellules acquièrent des propriétés analogues à des neurones sérotoninergiques hypothalamiques : synthèse de sérotonine à partir du 5-hydroxytryptophane (mais pas du tryptophane) et capture de sérotonine exogène (DE VITRY et al., 1986). Ceci confirme la nature pluripotente des cellules F7 dont on a montré antérieurement qu'elles étaient capables d'exprimer des fonctions oligodendrocytes en fonction de la composition du milieu. Ces résultats montrent le rôle décisif de facteurs humoraux dans la stabilisation de l'expression génétique aux stades précoces du développement des cellules nerveuses.

En ce qui concerne les neurones hypothalamiques dopaminergiques, faisant suite à la mise en évidence du rôle morphogénétique de la triiodothyronine (T_3), des sites nucléaires spécifiques de T_3 ont été mis en évidence dans des cultures hypothalamiques neuronales et dans des cultures hypothalamiques astrocytaires cultivées en milieu chimiquement défini et en absence de T_3 . Le nombre des sites T_3 augmente avec la durée de culture, aussi bien pour les neurones que pour les astrocytes, étant toujours plus élevé pour les neurones que pour les astrocytes. Par contre, leur affinité, qui est identique à celle observée pour le cerveau adulte, ne varie pas (J. PUYMIRAT et A. FAIVRE-BAUMAN, 1986). Par ailleurs, J. PUYMIRAT et coll. ont étudié l'ontogénèse des propriétés biochimiques des neurones hypothalamiques : capture de ^3H -DA in vivo et in vitro, libération de dopamine exogène et endogène en culture. Les résultats montrent que les neurones dopaminergiques hypothalamiques acquièrent progressivement en culture les propriétés de neurones adultes en ce qui concerne la synthèse, la capture et la libération de dopamine. En outre, on montre que la capacité de libérer la dopamine en réponse à une dépolarisation chimique précède la différenciation synaptique, ce qui suggère une

libération non synaptique, à partir de varicosités ou de terminaisons non synaptiques (J. PUYMIRAT et al., 1986). En outre, on constate que la maturation des neurones dopaminergiques exige un milieu chimiquement défini, nettement plus simple que celui permettant la maturation des neurones à thyrolibérine.

En ce qui concerne les neurones à thyrolibérine (TRH), l'exploitation du modèle précédemment établi par C. LOUDES et A. FAIVRE-BAUMAN pour l'étude en culture des mécanismes de libération du TRH s'est poursuivie. La recherche d'un contrôle par les neurotransmetteurs de la libération du TRH a mis en évidence un effet stimulant de la dopamine en présence d'un excès de K^+ , c'est-à-dire sur des neurones dépolarisés. Cet effet semble médié par des récepteurs D_2 . Par ailleurs, l'implication de l'activation de la protéine kinase C dans la libération du TRH a été recherchée à l'aide d'un ester du phorbol, le TPA. Celui-ci stimule la libération du TRH de manière dépendante de la dose et du temps (maximum : $10^{-7}M$ — 15-30 min). L'effet du TPA n'est que partiellement dépendant du calcium ; il n'est additif ni avec celui de la dopamine, ni avec celui du K^+ (LOUDES et al., 1986). Les recherches se poursuivent sur l'implication des différents types de canaux calciques dans la libération du TRH.

D. GROUSELLE a poursuivi le développement de plusieurs stratégies immunologiques nécessaires à l'étude, d'une part de la biosynthèse du TRH et d'autre part de son récepteur. Il a notamment obtenu un anticorps dirigé contre un heptapeptide allongé dérivé du TRH et qui devrait permettre l'identification des molécules précurseurs de la biosynthèse du TRH. De plus, en collaboration avec le groupe de P.A. CAZENAVE (Institut Pasteur), il a obtenu un anticorps anti-idiotypique du TRH, actif en système radioimmunologique, mais incapable d'inhiber la liaison du 3H -TRH sur les cellules GH3 intactes. Cependant, il reconnaît dans des extraits cellulaires préparés de façon appropriée une protéine d'environ 100 kD, dont la caractérisation se poursuit.

Enfin, dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de J. NUNEZ, nous avons suivi l'évolution qualitative et quantitative des protéines associées à la tubuline (MAPs) dans les premiers stades de l'élongation neuritique de cultures cérébrales en milieu défini. Les résultats suggèrent que les MAPs de haut poids moléculaires (MAP_2 et apparentées) seraient impliqués préférentiellement dans l'initiation neuritique, alors que les MAPs de faible poids moléculaire (Tau et apparentés) interviendraient dans l'extension neuritique (COUCHIE et al., 1986).

PUBLICATIONS

J. PUYMIRAT and A. FAIVRE-BAUMAN. *Evolution of triiodothyronine nuclear binding sites in hypothalamic serum-free cultures : Evidence for their presence in neurons and astrocytes (Neurosci. Letters, 68, 299-304, 1986).*

D. COUCHIE, A. FAIVRE-BAUMAN, J. PUYMIRAT, J. GUILLEMINOT, A. TIXIER-VIDAL and J. NUNEZ. *Expression of microtubule-associated proteins during the early stages of neurite extension by brain neurons cultured in a defined medium (J. Neurochem., 47, 1255-1261, 1986).*

F. DE VITRY, J. CATELON, M. DUBOIS, J. THIBAUT, D. BARRITAU, J. COURTY, S. BOURGOIN and M. HAMON. *Partial expression of monoaminergic (serotonergic) properties by the multipotent hypothalamic cell line F7. An example of learning at the cellular level (Neurochem. Int. 9, 43-53, 1986).*

F. DE VITRY, M. HAMON, J. CATELON, M. DUBOIS and J. THIBAUT. *Serotonin initiates and autoamplifies its own synthesis during mouse central nervous system development (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 8629-8633, 1986).*

S. BENJELLOUN, J.P. DELAUNOY, D. GOMES, F. DE VITRY, D. LANGUI and P. DUPOUEY. *Early expression of carbonic anhydrase II (CAII) in transitory glial cells of the developing murine nervous system (Developm. Neurosci., 8, 150-159, 1986).*

J.N. LAVERRIÈRE, A. TIXIER-VIDAL, N. BUISSON and D. GOURDJI. *Mechanisms involved in the regulation of prolactin gene transcription by thyroliberin (1st Int. Congress of Neuroendocrinology, July 9-11, 1986, San Francisco, Abstr. 143a, Neuroendocrinology, 1986).*

D. GOURDJI, J.M. SEQUIER, N. BUISSON and A. TIXIER-VIDAL. *Interaction of chlordiazepoxide with THR binding and biological effects in GH3/B6 rat pituitary cell strain (1st Int. Congress of Neuroendocrinology, July 9-11, 1986, San Francisco, Astr. 139, Neuroendocrinology).*

A. FAIVRE-BAUMAN, C. LOUDES, A. BARRET, D. GROUSELLE et A. TIXIER-VIDAL. *Culture de cellules hypothalamiques comme modèle d'étude de la libération de la thyrolibérine (TRH) (Abstr. XVI^e Colloque de la Société Neuroendocrinologie Expérimentale, Sptembre 1986, Marseille).*

D. GROUSELLE, A. FAIVRE-BAUMAN, C. LOUDES, D. GOURDJI et A. TIXIER-VIDAL. *Stratégies immunologiques pour l'étude du précurseur et du récepteur d'un petit neuropeptide, le TRH (pGlu-His-Pro-NH₂) (Abstr. XVI^e Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, septembre 1986, Marseille).*

E. VILA-PORCILE, R. PICART, A. TIXIER-VIDAL and C. TOUGARD. *Cellular and subcellular distribution of laminin in adult rat anterior pituitary (J. Histochem. Cytochem., 35, 287-299, 1987).*

J. PUYMIRAT, A. BARRET, A. FAIVRE-BAUMAN and A. TIXIER-VIDAL. *Biochemical characterization of the uptake and release of ³H-dopamine by dopaminergic hypothalamic neurons : a developmental study using serum free medium cultures* (*Developm. Biol.*, 119 [1] 75-84, 1987).

J.N. HUGUES, B. WOLF, J. SEBAOUN, N. BUISSON and D. GOURDJI. *Is thyroliberin receptor involved in thyrotroph adaptation to starvation* (*Acta Endocrinologica*, 115, 5146-5149, 1987).

C. LOUDES, A. FAIVRE-BAUMAN, A. BARRET, R. PICART and A. TIXIER-VIDAL. *Biochemical and morphological correlates of thyroliberin release in hypothalamic cell cultures grown in a serum-free medium* (*N.Y. Acad. Sci.*, 493, 581-584, 1987).

CONGRÈS

5^e Réunion du Groupe Peptide, 2-5 juin 1986, Le Touquet, D. GOURDJI.

4^e Colloque Annuel de la Société de Biologie Cellulaire, 11-13 juin 1986, Nantes, N. BRUNET.

Conférence on the Cellular and Molecular Biology of Hormone and Neurotransmitter containing Secretory Vesicles, 16-18 juin 1986, New York, A. FAIVRE-BAUMAN.

Colloque I.N.S.E.R.M., Animation de la Recherche, Communications Cellulaires et Pathologie, 25-28 juin 1986, Fréjus, D. GOURDJI.

Second European Congress on Cell Biology, 6-11 juillet 1986, Budapest, Hongrie, C. TOUGARD.

First International Congress of Neuroendocrinology, 9-11 juillet 1986, San Francisco, U.S.A., A. TIXIER-VIDAL, D. GOURDJI, J.N. LAVERRIÈRE.

XXXth Int. Congress Physiological Sciences, 13-18 juillet 1986, Vancouver, Canada, A. TIXIER-VIDAL.

XVI^e Colloque de Neuroendocrinologie Expérimentale, 10-13 septembre 1986, Marseille, A. TIXIER-VIDAL, F. DE VITRY, A. FAIVRE-BAUMAN, J. PUYMIRAT.

Colloque « Purification, Biosynthèse et Régulation des Récepteurs Membranaires », 8-12 septembre 1986, Cap d'Agde, D. GOURDJI.

Conférence I.N.S.E.R.M. « Mécanismes Cellulaires et Moléculaires de Migration et de Maturation Post-Traductionnelle dans la Sécrétion », 21-25 septembre 1986, Seillac, A. TIXIER-VIDAL, D. GOURDJI, C. TOUGARD, N. BRUNET, A. FAIVRE-BAUMAN, C. LOUDES.

XI^e European Symposium on Hormone and Cell Regulation, 29 septembre-2 octobre 1986, Mont Sainte-Odile, J.N. LAVERRIÈRE.

Congrès « European Tissue Culture Society », 8-10 octobre 1986, Heidelberg, R.F.A., A. TIXIER-VIDAL.

Conférence I.N.S.E.R.M. « Facteurs de croissance : rôle dans le développement et la pathologie », 12-16 octobre 1986, Seillac, N. BRUNET.

Minicolloque I.N.S.E.R.M., Animation de la Recherche : trafic intracellulaire impliqué dans l'élaboration, l'émission et la réception d'un signal : Approches de Biologie Cellulaire, La Londe-les-Maures, 22-25 octobre 1986, C. TOUGARD, N. BRUNET.

Minicolloque I.N.S.E.R.M. « Morphogénèse et Différenciation Cellulaire », novembre 1986, La Rochelle, F. DE VITRY.

11^e Conférence de Neurobiologie, novembre 1986, Gif-sur-Yvette, F. DE VITRY.

Winter Conference British Neuroendocrine Group, 15-17 décembre 1986, Nottingham, Angleterre, A. TIXIER-VIDAL.

CO-ORGANISATION DE CONGRÈS

5^e Réunion du Groupe Peptide, 2-5 juin 1986, Le Touquet, D. GOURDJI.

Conférence I.N.S.E.R.M. « Mécanismes Cellulaires et Moléculaires de Maturation Post-Traductionnelle dans la Sécrétion », 21-25 septembre 1986, Seillac, A. TIXIER-VIDAL.

Minicolloque I.N.S.E.R.M., 22-25 octobre 1986, La Londe-les-Maures, C. TOUGARD.

COURS ET SÉMINAIRES

Exposé dans le cadre des Conférences d'Actualité de l'I.N.S.E.R.M. U30, Hôpital des Enfants Malades, 28 novembre 1986, D. GOURDJI.

Présentation orale aux Journées Scientifiques de l'Institut de Biologie, décembre 1986, F. DE VITRY.

D.E.A. Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire, C.H.U. Bicêtre, A. TIXIER-VIDAL.

D.E.A. Physiologie de la Reproduction, Paris VI, cours et encadrement de séminaires d'étudiants, A. TIXIER-VIDAL.

Cours dans le cadre de l'Enseignement dirigé par Madame ADOLPHE à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, mars 1987, D. GOURDJI.

Séminaire dans le cadre des cours donnés par le Professeur F. MOREL au Collège de France (1987), J.N. LAVERRIÈRE.

Séminaire méthodologique sur les cultures cellulaires, D.E.A. d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire, 2 avril 1987, D. GOURDJI.

Exposé dans le cadre du cours du module de Cytophysiologie, Paris-Sud, Centre d'Orsay, 2 avril 1987, C. TOUGARD.

Séminaire dans le cadre des cours donnés par le Professeur J.P. CHANGEUX, 27 avril 1987, C. LOUDES.

Séminaire méthodologique sur « les techniques d'Immunocytochimie » dans le cadre du D.E.A. d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire, C.H.U. Bicêtre, 14 mai 1987, C. TOUGARD.

Séminaire à l'Unité I.N.S.E.R.M. U29, Neurobiologie du Développement, Hôpital Port-Royal, 15 mai 1987, A. FAIVRE.

Séminaire à l'Unité C.N.R.S. UA 1197, Neuroendocrinologie, Université des Sciences, Montpellier II, 5 juin 1987, A. FAIVRE.