

## Physiologie cellulaire

M. François MOREL, membre de l'Institut  
(Académie des Sciences), professeur

Dans le cours de l'année dernière, nous avons rappelé les différentes étapes de la cascade de réactions par lesquelles certaines hormones augmentent la concentration intracellulaire du calcium, puis nous avons discuté plus longuement les mécanismes par lesquels les ions calcium contrôlent, à leur tour, de nombreuses fonctions intracellulaires en s'associant spécifiquement à des protéines régulatrices dont la conformation est modifiée lorsqu'elles ont contracté des liaisons de coordination avec des ions calcium. Le cours de cette année a été consacré à l'analyse des premières étapes de cette cascade de réactions et plus particulièrement à celles qui conduisent au relargage transitoire du calcium séquestré dans certaines vésicules du réticulum endoplasmique.

\*  
\*\*

On sait que les hormones et les neuromédiateurs qui induisent sur leurs cellules cibles la production intracellulaire d'inositol trisphosphate et de diacylglycerol exercent leurs effets par un mécanisme de reconnaissance et de transduction dont les premières étapes sont analogues à celles précédemment reconnues pour les hormones qui stimulent la production intracellulaire d'AMP cyclique, à savoir :

a) L'agoniste se lie stéréospécifiquement à un récepteur moléculaire présent sur la face externe de la membrane cellulaire.

b) Le changement de conformation de la protéine réceptrice (qui résulte de cette interaction) se répercute sur la face intracellulaire, et confère au récepteur la propriété d'induire la dissociation d'une « G-protéine » régulatrice en ses sous-unités respectives  $\alpha$  et  $\beta\gamma$ , en catalysant un échange GTP-GDP sur la sous-unité  $\alpha$ .

c) Enfin, la sous-unité  $\alpha_{GTP}$  libre ainsi formée va activer la phospholipase C (la PLC, aussi nommée phosphatidylinositol bisphosphatase) et induire l'hydrolyse par cette enzyme du phosphatidylinositol bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) avec formation de deux deuxièmes messagers, le diacylglycerol (DAG) et l'inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>).

Il faut noter que ce mécanisme de transduction du signal hormonal porté par l'agoniste comporte deux étapes séquentielles d'amplification.

Il semble en effet que l'activation du récepteur (qui résulte de la liaison de l'agoniste) corresponde à un mécanisme d'amplification, dans la mesure où la G-protéine ne serait pas précouplée au récepteur libre ; dans cette hypothèse, une molécule de récepteur activé pourrait successivement lier et induire la dissociation de plusieurs molécules de G-protéine. Réciproquement, si les molécules de G-protéine étaient précouplées aux récepteurs libres, l'activation d'un récepteur conduirait à la dissociation d'une seule molécule de G-protéine.

La deuxième étape d'amplification que comporte ce mécanisme de transduction est évidemment l'activation de la PLC par la sous-unité  $\alpha_{GTP}$ . Pourtant, cette activation est limitée dans le temps par la propriété GTPasique de la sous-unité  $\alpha$  : la transformation  $\alpha_{GTP} \rightarrow \alpha_{GDP}$  induit la dissociation du complexe PLC- $\alpha$ , l'inactivation de la PLC, et la réassociation des  $\alpha_{ADP}$  formés avec les sous-unités  $\beta\gamma$  libres de la G-protéine.

\*

\*\*

On sait que, parmi les phospholipides membranaires, la PLC hydrolyse spécifiquement la liaison phosphodiester des phosphoinositides, et tout particulièrement celle du phosphatidylinositol-bisphosphate ( $PIP_2$ ), libérant ainsi, outre une molécule de DAG, une molécule de (1-4-5)triphosphoinositol ( $I(1.4.5)P_3$ ). Il est bien établi en outre que l'inositol(1.4.5)trisphosphate est responsable du relargage par les vésicules du réticulum endoplasmique de calcium ionisé dans la cellule. On sait enfin que cette action de l' $IP_3$  en tant que deuxième messenger est brève, car l'inositol(1.4.5)trisphosphate est rapidement hydrolysé par une inositol(5)phosphatase en Inositol(1.4)bisphosphate, biologiquement inactif.

Cependant, les nombreux travaux des deux dernières années ont révélé que la situation est loin d'être aussi schématique et que le métabolisme des inositols phosphates est en fait d'une grande complexité dans la plupart des tissus. Partant de l' $IP_3$  généré par hydrolyse du  $PIP_2$ , ce métabolisme comporte non seulement des voies de dégradation des inositol phosphates par déphosphorylation aboutissant finalement à l'inositol, mais aussi des réactions de phosphorylation conduisant à la formation d'inositol phosphorylé en 4, voire 5 et même 6 positions. Il apparaît aujourd'hui que l'inositol(1.3.4.5) tetrakisphosphate, formé à partir de l' $I(1.4.5)P_3$  sous l'action d'une I(3) phosphokinase spécifique, pourrait jouer un rôle physiologique important, au moins dans certains tissus ; c'est la raison pour laquelle les arguments expérimentaux récents suggérant un tel rôle ont été analysés en détail dans la première partie du cours.

\*

\*\*

La plupart des agonistes induisant la stimulation de la PLc et la production d'IP<sub>3</sub> entraînent, sur les différents systèmes biologiques où cela a pu être étudié, une augmentation biphasique du calcium intracellulaire dont on s'accorde à penser que la phase initiale et transitoire correspond à un relargage de calcium de réticulum induit directement par l'IP<sub>3</sub>, alors que la seconde phase, moins intense mais soutenue, correspond à une entrée dans la cellule de calcium extracellulaire qui résulte d'une augmentation de perméabilité membranaire au calcium secondaire à la 1<sup>re</sup> phase. Le déterminisme exact de cette seconde phase a suscité des controverses non encore apaisées ; l'analyse des divergences à l'origine de ces controverses suggère que plusieurs mécanismes différents pourraient expliquer, selon les types de cellules biologiques, le déterminisme de l'augmentation de perméabilité membranaire au calcium en cause. Ce problème, à savoir, celui des « canaux calciques commandés par des récepteurs », a conduit à décrire au moins 3 mécanismes différents.

1) Pour Irvine et Moor (*Biochem. J.* 240, 917, 1986), ce serait l'I(1.3.4.5)P<sub>4</sub> produit par phosphorylation de l'IP<sub>3</sub> qui, dans l'œuf d'oursin, induirait l'entrée de calcium externe nécessaire à l'obtention de la réaction complète de fertilisation. Mais le mécanisme exact par lequel l'IP<sub>4</sub> (en association avec l'IP<sub>3</sub>) produirait cette entrée de calcium n'a pas été analysé par les auteurs.

2) Pour Von Tscherner et al. (*Nature*, 324, 369, 1986), qui ont étudié la réponse de polynucléaires neutrophiles à une stimulation par le fMLP en utilisant la technique de « Patch Clamp », il existerait dans la membrane de ces cellules des canaux calciques (de faible sélectivité cationique) dont la probabilité d'ouverture augmenterait fortement lorsque la concentration du calcium intracellulaire s'élève au-dessus de 10<sup>-7</sup>M. Ces canaux ne sont que faiblement voltage-dépendants.

3) Pour Kuno et Gardner enfin (*Nature*, 326, 301, 1987), ce serait l'IP<sub>3</sub> lui-même qui ouvrirait des canaux calciques membranaires dans les lymphocytes T (et non l'augmentation de calcium intracellulaire qu'il induit, comme dans le cas précédent). En effet, par la technique de « Patch Clamp », ces auteurs observent dans la membrane des lymphocytes T la présence de canaux calciques insensibles au voltage et dont l'ouverture est provoquée par l'addition sur la face intracellulaire d'IP<sub>3</sub> à la concentration de 5 µM ou plus. Ces canaux d'une conductance unitaire de 7 pS sont sélectifs pour les ions Calcium et Baryum ; ils sont bloqués lorsque [Ca] dépasse 1 µM du côté intracellulaire.

Il sera plus facile de juger lequel — ou lesquels — parmi ces mécanismes possède un éventuel caractère de généralité lorsque des expériences similaires à celles décrites ci-dessus auront été effectuées sur un nombre suffisant de types cellulaires différents.

\*\*

Une partie importante du cours a porté sur les caractéristiques et la spécificité avec lesquelles l'IP<sub>3</sub> exerce son action de relargage du calcium sur les vésicules du réticulum endoplasmique.

L'utilisation d'IP<sub>3</sub> marqué par <sup>32</sup>P a permis de mettre en évidence la liaison de l'IP<sub>3</sub> à ses sites spécifiques d'action et d'en analyser les propriétés. Mais c'est surtout l'emploi de cellules perméabilisées par la digitonine ou la saponine qui a rendu possible l'étude directe de l'action de l'IP<sub>3</sub> sur le réticulum. En présence d'ATP, la concentration du Calcium ionisé ([Ca]<sub>i</sub>, mesurée à l'aide d'électrodes sélectives) dans des suspensions de cellules ainsi perméabilisées s'établit aux environs de 10<sup>-7</sup>M en raison de l'activité Ca-ATPase qui est présente dans les membranes de nombreuses vésicules et qui entraîne la séquestration du calcium dans ces vésicules. L'addition d'IP<sub>3</sub> au milieu déclenche une augmentation forte mais transitoire de [Ca]<sub>i</sub>, en perméabilisant certaines vésicules au calcium (celles qui contiennent des sites de liaison pour l'IP<sub>3</sub>). Le caractère transitoire de la réponse résulte des processus suivants : a) l'IP<sub>3</sub> est rapidement dégradé par déphosphorylation ; b) l'augmentation de [Ca]<sub>i</sub> inhibe la conductance calcique membranaire ouverte par l'IP<sub>3</sub> ; c) la Ca-ATPase repompe rapidement dans les vésicules le calcium qui en est sorti sous l'effet de l'IP<sub>3</sub>.

On vérifie aussi que l'IP<sub>4</sub> est pratiquement inactif sur les membranes du réticulum. Des additions successives d'IP<sub>3</sub> entraînent une désensibilisation très rapide de la réponse, pratiquement toujours observée. Cette désensibilisation est indirecte et résulte du fait que l'IP<sub>3</sub> n'agit que sur une très petite fraction des vésicules dont les membranes contiennent de la Ca-ATPase : lors d'une première application d'IP<sub>3</sub>, ces vésicules sont largement déplétées de leur stock de calcium, qui n'est ensuite que partiellement reconstitué, car le calcium qu'elles ont relargué est repompé dans l'ensemble des vésicules.

Il a été récemment montré qu'en plus de l'IP<sub>3</sub>, d'autres médiateurs sont capables de faire relarguer du calcium stocké dans des vésicules intracellulaires.

Ainsi, Chueh et Gill (*J. Biol. Chem.* 261, 13883, 1986) observent sur une lignée de cellules nerveuses perméabilisées que le GTP à la concentration de 10 μM induit la sortie de calcium par un mécanisme différent et indépendant de celui de l'IP<sub>3</sub>. Dans le cas de l'œuf d'oursin, Clapper et al. (*J. Biol. Chem.*, 262, 9561, 1987) mettent en évidence un effet du même type produit cette fois par un métabolite des nucléotides pyridiniques, actif avec une HE<sub>50</sub> de l'ordre de 40 nM et dont la structure moléculaire reste à établir. Ce métabolite provoque la libération de calcium à partir d'une population de vésicules différente de celle stimulée par l'IP<sub>3</sub> puisqu'on n'observe pas de désensibilisation croisée entre les deux agonistes.



Enfin, selon Wolf et al. (*J. Biol. Chem.*, 361, 3501, 1986), l'arachidonate (à 10  $\mu\text{M}$ ) serait également capable d'induire le relargage de calcium par les vésicules du réticulum, dans le cas des cellules des îlots pancréatiques au moins.

Pour les membranes des vésicules comme pour celles des cellules, il apparaît donc que plusieurs mécanismes contrôlant la perméabilité au calcium (en plus de l' $\text{IP}_3$ ) pourraient exister, dont l'importance physiologique et la généralité restent à démontrer.

\*

\*\*

Enfin, la dernière partie du cours a été consacrée à la discussion de divers travaux récents dont les résultats paradoxaux remettent en cause certaines de nos représentations qui, bien que souvent insuffisamment fondées, n'en sont pas moins généralement acceptées. On admet, par exemple, que le mécanisme de transduction de signaux hormonaux qui fait l'objet de ce cours peut être schématisé par une séquence linéaire de réactions, dans laquelle il est postulé notamment que c'est la formation d' $\text{IP}_3$  qui conditionne le relargage du calcium (en réponse à l'activation de la PLC) et non l'inverse. Pourtant (Lew et al., *J. Biol. Chem.*, 261, 13121, 1986), lorsqu'on fait pénétrer du calcium dans des promyélocytes en culture à l'aide d'un ionophore (1  $\mu\text{M}$  d'ionomycine), on observe que cela induit une synthèse d' $\text{IP}_3$  ainsi qu'une réponse biologique similaires — bien que plus lentes — à celles obtenues sur ces cellules en réponse à un agoniste spécifique, le fMLP. En fait, le calcium est lui-même un activateur de la PLC, de sorte que l' $\text{IP}_3$ , par son effet sur  $[\text{Ca}]_i$ , potentialise sa propre synthèse. Le système est donc rebouclé à ce niveau par une rétroaction positive. En outre, l'inositol (3) phosphokinase — qui catalyse la production d'inositol (1.3.4.5)tetrakisphosphate à partir de l'I 1.4.5  $\text{P}_3$  — est également une enzyme activée par le calcium, de sorte que, lorsque  $[\text{Ca}]_i$  est élevé dans la cellule, le métabolisme des inositol-phosphates est préférentiellement orienté vers la synthèse d' $\text{IP}_4$  plutôt que celle d' $\text{IP}_3$ , ce qui pourrait évidemment infléchir les réponses physiologiques obtenues puisque les deux inositol-phosphates ne produisent pas les mêmes effets dans la cellule.

Il semble de même qu'un couplage entre échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et mobilisation du calcium intracellulaire puisse exister dans les plaquettes (Siffert et Akkerman, *Nature*, 325, 456, 1987).

Enfin, de nombreuses interactions régulatrices semblent exister entre les mécanismes de signalisation passant respectivement par l'AMP cyclique et par l'inositol-trisphosphate, interactions qui mettent en jeu des réactions de phosphorylation contrôlées soit par la protéine-kinase A (cAMP dépendante), soit par la protéine-kinase C (DAG et Calcium).

F.M.

\*

\*\*

## PROGRAMME DES SÉMINAIRES

15 janvier : M.B. HARVEY : Deux mécanismes de la régulation du transport du sodium par les protons intracellulaires dans les épithéliums.

22 janvier : F. RUSSO-MARIE : Les lipocortines.

29 janvier : D. PAUPARDIN-TRISCH : Modulation des canaux calcium des neurones de mollusques : identification d'une protéine G dans des effets de la dopamine.

5 février : M. CASTAGNA : La protéine Kinase C : Structure et fonctions.

19 février : J. NARGEOT : L'utilisation de molécules photosensibles en pharmacologie moléculaire.

26 février : P. CHAMPEIL : Structure et propriétés fonctionnelles de l'enzyme responsable du transport de calcium dans le réticulum endoplasmique.

4 mars : S. HARBON : Régulation du métabolisme des phospho-inositides et de la synthèse des nucléotides cycliques dans le muscle utérin.

11 mars : D. LOUVARD : Biologie cellulaire et moléculaire d'un marqueur de différenciation des cellules intestinales.

18 mars : D. GOURDJI : Calcium et régulation peptidique de gènes spécifiques dans des lignées clonées de cellules antéhypophysaires de rat.

## TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

*I. CONTRÔLE DE LA POMPE A PROTONS SENSIBLE AU N-ETHYL-MALEIMIDE*

(C. KHADOURI, S. MARSY et A. DOUCET)

Des travaux antérieurs du laboratoire ont suggéré l'identité entre la pompe à protons et l'ATPase NEM-sensible présentes dans les membranes cellulaires de certains segments du néphron de rat. Les études entreprises cette année ont visé à rechercher les paramètres physiologiques qui contrôlent l'activité de cette pompe, et dans certains cas à analyser les mécanismes de ce contrôle. Nous avons ainsi recherché les effets des minéralocorticoïdes d'une part et de l'acidose et l'alcalose métabolique d'autre part.

S'il est bien établi que l'effet stimulateur des glucocorticoïdes sur l'excrétion acide urinaire est dû à une activation de l'échangeur Na/H, l'effecteur de l'action stimulatrice des minéralocorticoïdes est aujourd'hui inconnu. Nous avons donc recherché l'éventuelle implication de la pompe à protons dans

cette action. Pour cela, nous avons étudié les effets de la surrénalectomie et des minéralocorticoïdes sur l'activité ATPasique NEM-sensible dans les différents segments du néphron de rat. Chez les animaux surrénalectomisés (ADX) depuis 7 jours, le pH urinaire est augmenté, alors que le pH plasmatique reste inchangé. Ce résultat indique que chez les animaux ADX, il y a une inhibition de la sécrétion des protons, d'où l'augmentation du pH urinaire observée. Ces animaux développent une acidose métabolique qui est compensée par une alcalose respiratoire, adaptation qui intervient en faveur d'une normalisation du pH plasmatique.

Dans le même délai après la surrénalectomie, l'activité ATPasique NEM-sensible est diminuée de 60-65 % dans les portions corticales et médullaires du tubule collecteur, alors qu'elle est inchangée dans les autres segments du néphron. Ces résultats mettent en évidence une spécificité fonctionnelle topographique de la surrénalectomie sur l'activité ATPasique NEM-sensible. Cette localisation spécifique suggère l'implication des minéralocorticoïdes plutôt que des glucocorticoïdes, parce que le tubule collecteur est la cible majeure des minéralocorticoïdes. Par ailleurs, l'administration d'aldostérone à des animaux ADX augmente l'activité ATPasique NEM-sensible des tubules collecteurs corticaux et médullaires jusqu'à des valeurs comparables à celles observées chez des animaux normaux, ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle l'ATPase est contrôlée par les minéralocorticoïdes. Pour élucider le mécanisme sous-jacent à cette action stimulatrice de l'aldostérone sur l'ATPase NEM-sensible, nous avons eu recours à un système d'étude *in vitro* développé au laboratoire.

Lorsque des segments de tubules collecteurs (CCT et MCT) microdisséqués chez des rats ADX depuis 7 jours sont incubés pendant 3 h à 37 °C dans un milieu de survie contenant de l'aldostérone ( $10^{-8}$ M) l'activité ATPasique NEM-sensible est fortement stimulée par rapport à celle de tubules incubés pendant la même durée en absence d'hormone. L'effet de l'hormone est supprimé en présence de cycloheximide ou d'actinomycine D, ce qui démontre qu'une synthèse protéique est impliquée dans le processus.

Etant donné le rôle de l'ATPase NEM-sensible dans l'acidification urinaire, il nous a semblé intéressant de rechercher si les changements du métabolisme acido-basique rénal observé au cours de l'acidose ou de l'alcalose métabolique étaient accompagnés par des modifications de l'activité de la pompe rénale.

L'acidose et l'alcalose métabolique ont été respectivement induites en substituant des solutions de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou de  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M à l'eau de boisson pendant une semaine. Les animaux traités avec du  $\text{NaHCO}_3$  développent une alcalose métabolique attestée par une augmentation du pH et de la concentration en bicarbonate plasmatique. Cette alcalose est partiellement compensée par une acidose respiratoire. Inversement, les animaux traités avec du  $\text{NH}_4\text{Cl}$

développent une acidose métabolique partiellement compensée par une hyperventilation.

Au cours de l'acidose et de l'alcalose métabolique, l'activité ATPasique NEM-sensible est spécifiquement modifiée dans les parties médullaires de l'anse large de Henle et du tubule collecteur et, à un moindre degré, dans le tubule collecteur cortical, alors qu'elle n'est pas altérée dans les autres segments. Dans ces segments cibles, l'activité ATPasique est diminuée chez les animaux alcalotiques alors qu'elle est stimulée chez les acidotiques.

## II. CONTRÔLE *IN VITRO* DE LA Na-K-ATPase DU TUBULE COLLECTEUR CORTICAL (CCT) PAR L'ALDOSTÉRONNE ET LE SODIUM INTRACELLULAIRE

(C. BARLET-BAS, C. KHADOURI, S. MARSY et A. DOUCET)

On sait qu'*in vivo*, l'aldostérone stimule dans un délai de 3 heures la Na-K-ATPase dans le CCT d'animaux surrénalectomisés. Afin d'étudier les mécanismes moléculaires de cette action, nous avons développé un système *in vitro* permettant de reproduire l'effet stimulateur de l'hormone sur l'enzyme de CCT maintenus en survie. Un tel système permet de tester l'effet sur l'action hormonale d'agents pharmacologiques ne pouvant être administrés *in vivo* (compte tenu de leur toxicité ou de la difficulté à contrôler leur concentration).

Lorsque des CCT de rats surrénalectomisés sont préincubés pendant 2 à 3 heures à 37 °C en présence d'aldostérone et de triiodothyronine (qui exerce un effet permissif sur l'action de l'aldostérone), l'activité Na-K-ATPasique est fortement stimulée. Parallèlement à cette stimulation de l'activité de l'enzyme, on observe une augmentation du nombre de sites catalytiques, estimé par la liaison spécifique d'ouabaïne tritiée. Ce dernier résultat plaide en faveur d'une synthèse de novo de l'enzyme. De plus, l'augmentation de l'activité induite par l'aldostérone est totalement abolie en présence d'actinomycine D ou de cycloheximide, qui inhibent respectivement la transcription et la traduction.

Enfin, l'action stimulatrice de l'aldostérone sur la Na-K-ATPase est indépendante de l'entrée luminale de sodium, puisqu'elle n'est pas abolie en présence d'amiloride, un bloquant des canaux apicaux du sodium, ou lorsque le sodium du milieu est remplacé par de la choline.

Le sodium intracellulaire intervient dans le contrôle de la vitesse de fonctionnement de la Na-K-ATPase en tant que substrat, mais aussi en tant que facteur de régulation du nombre d'unités enzymatiques. En effet, lorsque des CCT de rats normaux sont préincubés pendant 2 à 3 heures à 37 °C en présence d'un ionophore à sodium, la nystatine, le  $V_{\max}$  de l'enzyme est très significativement stimulé. Cette stimulation de l'activité de la Na-K-ATPase

par la nystatine est effectivement liée à des modifications de la concentration du sodium intracellulaire, puisqu'elle ne s'observe plus lorsque le sodium du milieu est substitué par de la choline. Bien que l'augmentation du sodium intracellulaire implique la mise en place de nouvelles unités Na-K-ATPasiques (l'activité enzymatique et la liaison spécifique d'ouabaïne tritiée sont stimulées de façon parallèle), il n'y a pas de synthèse de novo de l'enzyme. En effet, l'action stimulatrice du sodium sur la Na-K-ATPase n'est pas abolie par les inhibiteurs de synthèse protéique. Ce résultat suggère fortement l'existence d'un pool d'unités Na-K-ATPasiques latentes qui est recruté suite à une augmentation du sodium intracellulaire.

### III. RÉCEPTEURS RÉNAUX DE L'INSULINE

(D. BUTLEN et S. ROSEAU)

Les sites d'action de l'insuline le long du néphron de rat ont été recherchés en étudiant sur des glomérules et fragments tubulaires microdisséqués les sites de liaison fixant spécifiquement l'insuline humaine marquée à l'Iode  $I^{125}$  sur la Tyr A<sup>14</sup> ( $[^{125}I]$ insuline).

Les liaisons totale et non spécifique de ( $^{125}I$ ) insuline augmentent linéairement en fonction du nombre de glomérules ou de la longueur tubulaire. Les études cinétiques montrent que la liaison spécifique de ( $^{125}I$ ) insuline sur les glomérules et tubules est saturable en fonction du temps d'incubation et de la dose hormonale utilisée, réversible après élimination du ligand radioactif libre du milieu d'incubation, et compétitivement inhibée par de l'insuline humaine non marquée. L'analyse des résultats dans les systèmes de coordonnées de Scatchard et de Hill révèle l'existence d'un phénomène de coopérativité négative dans les processus d'interaction entre l'insuline marquée et deux classes de sites de fixation interdépendants, dont les constantes apparentes de dissociation et les coefficients de Hill sont respectivement de 0.6 nM et 0.60 dans les glomérules et compris entre 1 et 10 nM et entre 0.55 et 0.80 pour les différents segments tubulaires étudiés. La stéréospécificité des sites de liaison a été testée sur la base d'expériences de compétition montrant que les insulines bovine et porcine sont aussi efficaces que l'insuline humaine pour déplacer la ( $^{125}I$ ) insuline, alors que les chaînes A et B de l'insuline et d'autres hormones peptidiques sont totalement inactives.

Ces résultats indiquent que les sites spécifiques liant la ( $^{125}I$ ) insuline correspondent vraisemblablement aux récepteurs physiologiques de l'insuline.

Mentionnons enfin que les plus fortes densités de récepteurs de l'insuline ont été trouvées dans le tubule contourné proximal et le tubule contourné distal et les plus faibles dans l'anse ascendante large de l'anse de Henle et dans le canal collecteur médullaire.

IV. EFFETS COMPARÉS DE LA NYSTATINE ET DU CRYPTAND (221)C<sub>10</sub> SUR DES TUBULES RÉNAUX MAINTENUS EN SURVIE IN VITRO.

(R.M. RAJERISON, A. HUS-CITHAREL, M. FAURE et F. MOREL)

Il est bien établi que la nystatine augmente la perméabilité au sodium et au potassium des membranes lipidiques artificielles, comme celle des membranes cellulaires. En 1987, Castaing et al. (J. Membrane Biol. 97, 79-95) ont montré que le cryptand (221)C<sub>10</sub> (synthétisé au Laboratoire de Chimie et des Interactions Moléculaires, Pr Lehn) induit dans des membranes vésiculaires de phospholipides une perméabilité plus importante au sodium (Km apparent = 16.6 mM) qu'au potassium (Km apparent = 85.5 mM). Aussi avons-nous estimé intéressant de comparer les effets de cet ionophore, sélectif du sodium, à ceux de la nystatine sur les concentrations intracellulaires de sodium ( $[Na_i]$ ) et de potassium ( $[K_i]$ ) de tubules rénaux maintenus en survie *in vitro*.  $[Na_i]$  et  $[K_i]$  ont été déterminées par microspectrophotométrie de flamme. L'étude a porté sur la branche ascendante de l'anse de Henle (MAL) et sur le canal collecteur (MCT) de la medulla externe de rein de rat.

L'addition de 25  $\mu$ M de nystatine ou de 10  $\mu$ M de cryptand dans le milieu d'incubation provoque une augmentation rapide de la concentration intracellulaire de sodium (de 20 à 112 mEq/l) associée à une réduction équivalente de celle du potassium (de 110 à 12 mEq/l), de telle sorte que la pression osmotique du compartiment intracellulaire reste constante, sauf quand il s'agit de MCT traités par le cryptand (221)C<sub>10</sub>. Dans ce cas, les cellules accumulent du sodium ( $[Na_i]$  passe de 13 à 65 mEq/l) en perdant peu de potassium ( $[K_i]$  passe de 99 à 83 mEq/l) et gonflent, car la pression osmotique intracellulaire a dû augmenter. Ces résultats révèlent non seulement une différence de sélectivité ionique de la nystatine et du cryptand (221)C<sub>10</sub> — la nystatine induit un échange Na/K, tandis que le cryptand induit le transport rhéogénique de Na<sup>+</sup> —, mais aussi une différence quant aux propriétés des membranes cellulaires du MCT et du MAL. Ainsi les membranes de MAL seraient plus perméables au potassium que celles de MCT et permettraient un meilleur échange entre le potassium intracellulaire et le sodium pénétrant dans la cellule par le cryptand (221)C<sub>10</sub>.

Ces hypothèses ont été confirmées par les relations qui existent entre la variation du contenu intracellulaire de sodium (mesurée à l'équilibre) et la concentration de nystatine ou de cryptand. La concentration de nystatine, nécessaire pour induire une variation égale à la moitié de la variation maximale de  $[Na_i]$  est plus faible sur le MCT que sur le MAL (5 vs 15  $\mu$ M). Cette sensibilité à la nystatine du MCT, supérieure à celle du MAL, reflète probablement le fait que l'activité de la pompe à sodium est plus faible dans le MCT que dans le MAL (Katz et al., Am. J. Physiol., 237 : F114-F120, 1979). Cependant, le cryptand (221)C<sub>10</sub> est moins efficace sur le MCT que sur

le MAL pour augmenter la concentration intracellulaire de sodium (la moitié de l'effet maximal a été obtenue avec une concentration de cryptand de 17  $\mu\text{M}$  (MCT) et 8  $\mu\text{M}$  (MAL) ), car l'effet de cet ionophore dépend aussi de la capacité de la membrane cellulaire à assurer le mouvement passif de potassium, comme cela a été discuté auparavant.

Nous avons aussi entrepris de comparer les propriétés de la nystatine avec celles des cryptates artificiels (221)<sub>10</sub> et (222)C<sub>10</sub> sur le couplage qui existe entre transport actif des ions et métabolisme énergétique.

La méthode utilisée pour mesurer le métabolisme oxydatif de segments individuels de néphron de rat repose sur l'utilisation de substrats organiques uniformément marqués par le <sup>14</sup>C ([U<sup>14</sup>C]Glucose ou [U<sup>14</sup>C]Lactate) et le recueil du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> métabolique formé.

Lors de travaux antérieurs, nous avons montré qu'une fraction importante du métabolisme énergétique de ces fragments tubulaires uniques en survie (50 à 80 %) est directement couplée à l'activité de la pompe Na-K-ATPase. Ces résultats ont été obtenus dans la branche large ascendante corticale (CAL) et médullaire (MAL), ainsi que dans le canal collecteur cortical (CCT) et médullaire (MCT).

Les résultats obtenus indiquent que la nystatine (20  $\mu\text{M}$ ) entraîne une augmentation de la production métabolique de CO<sub>2</sub> durable (CCT) et fonction de la dose ajoutée au milieu (CAL, MAL) avec un K<sub>m</sub> apparent de 15  $\mu\text{M}$  et un coefficient de Hill de 2,23.

Cette stimulation importante de la production métabolique de CO<sub>2</sub> traduit une augmentation du transport actif de Na<sup>+</sup> par la pompe Na-K-ATPase, résultant d'une entrée accrue de Na<sup>+</sup> dans la cellule sous l'effet de la nystatine.

Le cryptate (221)C<sub>10</sub> (10  $\mu\text{M}$ ) produit les mêmes effets que la nystatine, avec une efficacité sensiblement équivalente (CAL, MAL, CCT). Dans le CAL, on obtient une courbe sigmoïde en fonction de la concentration en cryptate avec un K<sub>m</sub> apparent de 7,7  $\mu\text{M}$ .

Dans la branche large ascendante corticale (CAL), le (221)C<sub>10</sub> induit clairement une augmentation de la conductance au Na<sup>+</sup> à travers la membrane cellulaire. En effet, l'augmentation de la production de CO<sub>2</sub> produite par le cryptate persiste en l'absence de Cl<sup>-</sup> dans le milieu d'incubation et est abolie par l'addition d'ouabaine (2 mM). Par contre, dans les mêmes conditions expérimentales, le (222)C<sub>10</sub> (10  $\mu\text{M}$ ) n'entraîne pas d'augmentation de la production de CO<sub>2</sub>, ce qui confirme la faible capacité de ce cryptate à transporter le Na<sup>+</sup>.

Dans le canal collecteur cortical (CCT), l'action du (221)C<sub>10</sub> est plus complexe. Les résultats obtenus suggèrent que cette molécule agit aussi

comme un agent découplant. En effet, l'augmentation de la production de CO<sub>2</sub> due au cryptate persiste en présence d'ouabaine (2mM) ou en l'absence de Na<sup>+</sup> dans le milieu d'incubation. A l'inverse, l'augmentation du métabolisme oxydatif produit sous l'action de la nystatine est supprimée par addition d'ouabaine (2mM).

V. *STIMULATION DE L'ADÉNYL-CYCLASE RÉNALE PAR LE PEPTIDE INTESTINAL VASOACTIF (VIP) : LOCALISATION DE CET EFFET LE LONG DU NÉPHRON DE LAPIN.*

(D. CHABARDES, M. IMBERT-TEBOUL, en collaboration avec N.M. GRIFFITHS et M.L. SIMMONS de l'Université de Newcastle)

N.M. Griffiths et M.L. Simmons avaient précédemment observé que le VIP stimule l'adényl-cyclase de préparations membranaires de rein de lapin ; le microdosage de l'adényl-cyclase a été utilisé afin de définir les sites d'action du VIP le long du néphron.

Le VIP, utilisé à 1 µM, agit sur plusieurs segments du néphron : la partie initiale du tubule contourné distal et la partie interne du canal collecteur médullaire (facteurs de stimulation de 10,1 et 7,8 respectivement) ; bien que plus faible, un effet du VIP a été aussi observé sur la partie granuleuse du tubule contourné distal et la partie externe du canal collecteur médullaire (facteurs de 2,0 et 2,5).

La demi-activation maximale de l'adényl-cyclase a été obtenue pour des concentrations de VIP de 20 à 30 nM suivant le segment étudié.

Ces observations permettent de localiser les sites d'action du VIP le long du néphron de lapin ; l'amplitude des réponses observées montre que ce peptide a un rôle régulateur physiologique sur le tubule rénal.

PUBLICATIONS

A. DOUCET and C. BARLET-BAS. *In vitro induction of kidney Na-K-ATPase by aldosterone and intracellular sodium : Evidence for two different mechanisms (Vth Int. Conf. on Na-K-ATPase, Aarhus, Denmark, June 14-19, 1987, Abstr.).*

C. BAS-BARLET, S. MARSY and A. DOUCET. *In vitro induction of Na-K-ATPase in the rat collecting tubule : role of aldosterone and of intracellular sodium (Xth Intern. Congr. Nephrol., London, July 26-31, 1987, Abstr.).*

A. DOUCET and S. MARSY. *Evidence for a potassium-stimulated ATPase activity in the distal nephron : stimulation by potassium depletion (Xth Intern. Congr. Nephrol., London, July 26-31, 1987, Abstr.).*



C. KHADOURI, S. MARSY, C. BARLET and A. DOUCET. *Effect of adrenalectomy and chronic metabolic acidosis and alkalosis on rat tubular H-ATPase activity (Xth Intern. Congr. Nephrol., London, July 26-31, 1987, Abstr.).*

D. CHABARDES, M. MONTEGUT and S. SIAUME-PEREZ. *PGE<sub>2</sub> and  $\alpha$ -adrenergic effects on hormonal cAMP accumulation in the cortical ascending limb (CAL) and the cortical collecting tubule (CCT) (Xth Intern. Congr. Nephrol., London, July 26-31, 1987, Abstr.).*

C. BRICK, M. MONTEGUT, S. SIAUME-PEREZ and D. CHABARDES. *PGE<sub>2</sub> inhibition of vasopressin (AVP)-stimulated cAMP accumulation in the rabbit cortical collecting tubule (CCT) (Xth Intern. Congr. Nephrol., London, July 26-31, 1987. Abstr.).*

M. CASTAING, and J.-M. LEHN. *Efficiency, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> selectivity and temperature dependence of ion transport through lipid of the membranes by (221)<sub>10</sub>-Cryptand, an ionizable mobile carrier (J. Membr. Biol., 96, 79-95, 1987).*

D. CHABARDES, N.M. GRIFFITHS, M. IMBERT-TEBOUL, M. MONTEGUT, F. MOREL and N.L. SIMMONS. *Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-sensitive adenylate cyclase along the rabbit kidney tubule in vitro (Proceed. Physiol. Soc., Cambridge, J. of Physiology, 396, 51P, 1987. Abstr.).*

A. DOUCET. *Multiple hormonal control of kidney tubular functions (NIPS, 2, 141-146, 1987).*

C. KHADOURI, C. BARLET-BAS and A. DOUCET. *Mechanism of increased tubular Na-K-ATPase during streptozotocin-induced diabetes (Pflügers Arch., 409, 296-301, 1987).*

M. IMBERT-TEBOUL, A. DOUCET, S. MARSY and S. SIAUME-PEREZ. *Alterations of enzymatic activities along the rat collecting tubule in potassium depletion (Am. J. Physiol., 253 ; Renal Fluid Electrolyte Physiol. 22 ; F408-F417, 1987).*

A. DOUCET and S. MARSY. *Characterization of Na-K-ATPase activity in the distal nephron : stimulation by potassium depletion (Am. J. Physiol. 253 ; Renal Fluid Electrolyte Physiol. 22 ; F418-F423, 1987).*

C. KHADOURI, S. MARSY, C. BARLET-BAS and A. DOUCET. *Effect of adrenalectomy on NEM-sensitive ATPase along the rat nephron and on urinary acidification (Am. J. Physiol., 253 ; Renal Fluid Electrolyte Physiol. 22 ; F495-F499, 1987).*

F. MOREL and A. DOUCET. *Hormonal control of the Na-K-ATPase : an overview (XIIIth Eur. Symp. on Hormone and Cell Regulation, Mt. Ste-Odile, October 5-8, 1987).*

J. MARCHETTI, S. TANIGUCHI and F. MOREL. *Cytosolic free Na<sup>++</sup> in single microdissected rat cortical collecting tubule (CCT). Sensitivity to changes in extracellular Ca<sup>++</sup> (12th Intern. Symp. Hormone and Cell Regulation, Mt. Ste-Odile, October 5-8, 1987, Abstr.).*

F. MOREL, S. TANIGUCHI and J. MARCHETTI. *Cell permeability to calcium measured with Fura 2 in single rat cortical collecting tubule. (20th Annual Meet. of the Amer. Soc. of Nephrol., Washington, December 13-16, 1987, Abstr.)*.

C. FAUTH, M. CLAIRE, D. CHABARDES, J.P. KRAEHNBUHL, H. DIGGELMANN, B. ROSSIER and F. ROCH-RAMEL. *Establishment of a rabbit epithelial cell line derived from S2 segments of the proximal tubule (Société Suisse de Néphrologie, 1987. Abstr.)*.

F. MOREL. *Régulation hormonale du fonctionnement rénal (2<sup>e</sup> Colloque d'Animation de la Recherche. I.N.S.E.R.M. In : Communication cellulaire et Pathologie. Ed. C. Kordon & L. Degros. I.N.S.E.R.M., J. Libbey, pp. 19-21, 1988)*.

C. BARLET-BAS, C. KHADOURI, S. MARSY and A. DOUCET. *Sodium-independent in vitro induction of Na-K-ATPase by aldosterone in renal target cells : permissive effect of triiodothyronine (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 1707-1711, 1988)*.

F. MOREL. *Hormonal regulation of the sodium pump in different nephron segments (VIth Europ. Colloq. Renal Physiol., Varna, Bulgaria, May 22-26, 1988). Invited Lecture*.

A. HUS and F. MOREL. *Effects of (222)C<sub>10</sub>-Cryptand and nystatin on metabolic CO<sub>2</sub> production by isolated tubules of rat nephron (VIth Europ. Colloq. Renal Physiol., Varna, Bulgaria, May 22-26, 1988, Abstr.)*.

D. BUTLEN, S. VADROT, S. ROSEAU and F. MOREL. *Distribution of insulin receptors in the rat nephron (VIth Europ. Colloq. Renal Physiol., Varna, Bulgaria, May 22-26, 1988. Abstr.)*.

C. BARLET-BAS, C. KHADOURI, S. MARSY and A. DOUCET. *In vitro control of Na-K-ATPase by intracellular sodium in the rat collecting tubule (VIth Europ. Colloq. Renal Physiol., Varna, Bulgaria, May 22-26, 1988, Abstr.)*.

R.M. RAJERISON, M. FAURE and F. MOREL. *Comparative effects of a Na-sensitive (221)C<sub>10</sub>-Cryptand and nystatin on cation content of isolated rat kidney tubules (VIth Europ. Colloq. Renal Physiol., Varna, Bulgaria, May 22-26, 1988. Abstr.)*.

#### CONFÉRENCES, CONGRÈS ET MISSIONS

M. F. MOREL a fait des exposés sur invitation à la 55<sup>e</sup> Réunion de l'Association des Physiologistes (Bordeaux, juillet 1987), au 6<sup>e</sup> Colloque Européen de Physiologie Rénale (Varna, Bulgarie, mai 1988), à l'Université de Lausanne (mai 1988) ; avec A. DOUCET, il a fait un exposé sur invitation au

12<sup>e</sup> Symposium Européen sur les Hormones et la Régulation cellulaire, dont il était l'un des organisateurs et auquel S. TANIGUCHI et J. MARCHETTI ont également présenté une communication (Mont Ste-Odile, octobre 1987).

D'autre part, M. A. DOUCET a participé et donné des exposés sur invitation à la 4<sup>e</sup> Conférence Internationale sur la Na-K-ATPase (Aarhus, Danemark, juin 1987) et au 10<sup>e</sup> Congrès International de Néphrologie (Londres, juillet 1987). Il a été invité au Colloque « Anti-Hormones and Blood Pressure » (Villeneuve-lez-Avignon, novembre 1987) et à la Conférence sur la Biologie Cellulaire et Moléculaire du Sodium (Yale, décembre 1987).

D. BUTLEN, R. RAJERISON, C. BARLET-BAS et A. HUS-CITHAREL ont présenté chacun une communication au 6<sup>e</sup> Colloque de Physiologie Rénale (Varna, Bulgarie, mai 1988).

A. DOUCET et F. MOREL ont participé à la 20<sup>e</sup> Réunion de la Société Américaine de Néphrologie (Washington, décembre 1987).

D. CHABARDES et S. TANIGUCHI ont participé au 10<sup>e</sup> Congrès International de Néphrologie de Londres (décembre 1987).

D. CHABARDES a effectué une mission à l'Université de Newcastle dans le cadre d'une Coopération avec le Pr SIMMONS.

#### ENSEIGNEMENT

Différents chercheurs du laboratoire ont participé à des enseignements de 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> cycle : D. BUTLEN au D.E.A. d'endocrinologie (Paris 6) ; A. DOUCET à la Maîtrise de Biochimie de Paris 6 ; C. BARLET-BAS au Magistère de Biologie et à la préparation à l'Agrégation de Sciences Naturelles de Paris 6 ; D. BUTLEN, A. DOUCET, R. RAJERISON et F. MOREL au D.E.A. de Physiologie et Physiopathologie rénales (Paris 7).

#### DISTINCTION

M. F. MOREL a été fait Docteur Honoris Causa de la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne.

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

Responsable : M<sup>me</sup> A. TIXIER-VIDAL, Directeur de Recherche C.N.R.S.

RAPPORT D'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

Juin 1987 — Juin 1988

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-hypophysaire. On utilise, comme modèles, des cellules en culture précédemment caractérisées : lignées et cultures primaires de cellules antéhypophysaires sécrétant de la prolactine, d'une part, et de cellules hypothalamiques de souris fœtales, d'autre part.

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

Les recherches préfèrent, depuis plusieurs années, un modèle réactionnel de choix : l'interaction d'un neuropeptide, la thyrolibérine (TRH), avec un modèle homogène de cellules cibles, le clone GH3/B6 de cellules à prolactine. On a précédemment montré que les cellules GH3 possèdent de nombreux sites récepteurs pour le TRH. L'occupation de ces sites stimule les deux phases du processus sécrétoire de la prolactine, soit : 1. la libération d'un compartiment préformé de prolactine, 2. la néosynthèse de la prolactine qui résulte de la stimulation rapide de la transcription du gène de la prolactine. Les travaux publiés cette année sont relatifs à cet effet transcriptionnel du TRH.

J.N. LAVERRIÈRE a poursuivi, sous la direction de D. GOURDJI, ses recherches sur les mécanismes cytoplasmiques de l'effet transcriptionnel du TRH. Il a montré d'abord que l'effet stimulant du TRH sur la transcription du gène de la prolactine est corrélé temporellement et quantitativement à l'occupation des récepteurs du TRH. En outre, le maintien de l'effet transcriptionnel maximum requiert l'occupation persistante d'une partie seulement (40 % environ) des sites récepteurs. Par ailleurs, il a obtenu de nouveaux arguments expérimentaux en faveur de l'hypothèse précédemment avancée, que les messagers intracellulaires impliqués dans l'effet rapide du TRH sur la libération de la prolactine seraient également responsables de ses effets transcriptionnels. Il a donc comparé à ceux du TRH les effets transcriptionnels d'activateurs de la protéine kinase C (TPA) et des agents induisant une augmentation de la concentration du  $Ca^{2+}$  cytosolique (A 23187, ionomycin, Bay K8644). Il constate que tous ces agents stimulent la transcription du gène de la prolactine, mais à des degrés moindres que le TRH, sauf le Bay K 8644

qui, à lui seul, est aussi efficace que le TRH. En outre, aucun de ces agents n'exerce un effet additif avec le TRH indiquant que ce dernier agit par les mêmes mécanismes intracellulaires. Il en conclut que l'influx de  $Ca^{2+}$  induit par le TRH joue un rôle prédominant dans l'effet transcriptionnel qu'il exerce sur le gène de la prolactine (LAVERRIÈRE et al, 1988).

Un nouvel aspect des effets transcriptionnels du TRH a été mis en évidence par Andréa WEISMAN (stagiaire post-doctoral U.S.A.), sous la direction de D. GOURDJI. Le TRH induit un accroissement précoce et transitoire du taux des ARNm c-fos, alors qu'il n'a pas d'effet sur le taux des ARNm N-myc. Il augmente également le taux des ARNm de  $\beta$ -actin, mais avec une amplitude moindre. Cet effet, observé sur des cellules GH3/B6 quiescentes, n'est pas lié à une induction mitotique (WEISMAN et al, 1987). On analyse maintenant le rôle éventuel des messagers intracellulaires du TRH sur la réponse de c-fos.

Par ailleurs, en relation avec le groupe de Françoise PEILLON (I.N.S.E.R.M., U 223), D. GROUSELLE a mis en évidence, dans des adénomes humains non sécréteurs, des quantités significatives de TRH immunoréactif, identifié également en HPLC. Ces quantités ne sont pas corrélées au nombre des sites de liaison du TRH dans les mêmes tumeurs. Le rôle et l'origine de ce TRH antéhypophysaire sont encore inconnus (LE DAFNIET et al, 1987).

Les recherches sur les mécanismes cellulaires de sécrétion de la prolactine, ainsi que sur la nature et le rôle de composants de la matrice extracellulaire (Groupe C. TOUGARD) se sont poursuivies. Elles font l'objet de manuscrits sous presse ou soumis.

## II. DÉVELOPPEMENT DES NEURONES HYPOTHALAMIQUES DE SOURIS

Les résultats publiés cette année s'inscrivent dans la poursuite des recherches conduites depuis plusieurs années sur ce modèle neuronal selon deux axes : 1. identification et mode d'action de facteurs épigénétiques solubles actifs sur la différenciation biochimique et fonctionnelle de neurones hypothalamiques, 2. ontogénèse de propriétés spécifiques des neurones hypothalamiques à thyrolibérine.

F. DE VITRY a poursuivi ses recherches visant à démontrer un rôle auto-inducteur de neurotransmetteurs sur la différenciation de neurones centraux. Après avoir montré l'effet auto-inducteur d'agonistes sérotoninergiques sur la différenciation de neurones hypothalamiques de type sérotoninergique, elle a abordé le rôle d'agonistes dopaminergiques. Elle a obtenu des résultats préliminaires montrant une augmentation de l'activité décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) dans des cultures de tronc cérébral traitées de façon répétitive avec un agoniste D2 (DE VITRY et al, 1988). De plus, elle a

mis en évidence par hybridation *in situ*, une expression très précoce du gène codant pour l'anhydrase carbonique (CA II) spécifique des oligodendrocytes dans des cellules n'exprimant pas encore le phénotype oligodendrocytaire, et ceci dans plusieurs régions du cerveau (DE VITRY et al, sous presse, J. Neurochem. Int.).

Annie FAIVRE-BAUMAN et ses collaborateurs ont poursuivi l'étude de l'ontogénèse des propriétés biochimiques et fonctionnelles des neurones hypothalamiques à thyrolibérine cultivés en milieu chimiquement défini. On a précédemment montré que dans ces conditions, les neurones à TRH achèvent en culture les étapes terminales de leur différenciation : augmentation du contenu en TRH, formation de synapses, acquisition de la capacité de répondre à des agents dépolarisants par la libération de TRH dans le milieu. Elle a maintenant abordé l'étude des mécanismes de biosynthèse. On sait que le TRH est synthétisé sous forme d'un précurseur qui fait l'objet d'une maturation enzymatique encore incomplètement connue. Seule est bien comprise l'étape terminale qui consiste dans l'amidation du tripeptide Gln-His-Pro à partir d'une extension glycine C terminale. L'enzyme d'amidation (PAM) a été bien caractérisé par le groupe MAINS-EIPPER aux U.S.A. dans l'antéhypophyse et l'hypothalamus. Le travail publié cette année par A. FAIVRE-BAUMAN présente deux aspects. L'étude de l'ontogénèse de l'activité PAM *in vivo* met en évidence une phase de croissance aiguë entre 5 et 8 jours post-nataux, le niveau adulte étant atteint déjà à 15 jours. Le même profil d'activité s'observe *in vitro* dans les conditions de culture où cependant l'augmentation du contenu du TRH est plus faible qu'*in vivo*. A. FAIVRE-BAUMAN a donc recherché les effets de l'ascorbate qui est un co-facteur nécessaire de la PAM. L'addition continue d'ascorbate au milieu de culture augmente le contenu en TRH des cultures de façon croissante en fonction du temps (jusqu'à 16 jours *in vitro*) avec un pourcentage maximum (343 %) observé entre 9-13 jours de culture. Cet effet est fonction de la dose d'ascorbate. En outre, dans les conditions optimales de traitement, l'ascorbate augmente de façon considérable (500 %) la quantité de TRH libéré en réponse à une dépolarisation chimique. L'augmentation de l'activité de la PAM induite par l'ascorbate serait responsable d'une accélération de l'étape terminale de maturation en réponse à la dépolarisation chimique (FAIVRE-BAUMAN et al, 1988). Une meilleure compréhension de ce phénomène est attendue des recherches en cours sur la biosynthèse du TRH et l'identification immunologique de ses formes précurseurs.

Dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de C. HEIZMANN à Zurich, qui s'intéresse à deux protéines de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$ , particulièrement abondantes dans le cerveau — la parvalbumine et la calbindin  $\text{D}_{28\text{K}}$  — l'expression de ces deux protéines a été suivie par immunocytochimie au cours du développement neuronal dans nos cultures de cellules hypothalamiques. La parvalbumine est exprimée précocement dans tous les neurones, mais son

niveau d'expression décroît nettement avec la maturation neuronale. Inversement, la calbindin  $D_{28K}$  n'est exprimée précocement que dans une faible proportion de neurones, puis reste limitée à une subpopulation neuronale où elle se maintient, quelle que soit la durée de culture. Les effets d'une dépolarisation chimique brève (3 min), suivie de repolarisation brève ont été également examinés. Seule, la parvalbumine est affectée par ces traitements : l'immunoréactivité disparaît après la dépolarisation et est restaurée par la repolarisation. Les études immunochimiques conduites parallèlement suggèrent que la perte de l'immunoréactivité reflète une dissociation du complexe  $Ca^{2+}$ -parvalbumine. La parvalbumine pourrait jouer un rôle majoritaire dans les mouvements de calcium liés à l'exocytose des vésicules synaptiques qui se produit lors de la dépolarisation (PFYFFER et al, 1987).

Les premières données relatives à une caractérisation des cellules épendymaires dans les cultures de cellules hypothalamiques, ainsi que les conditions de culture permettant leur enrichissement, ont été obtenues et publiées par J. GABRION, qui poursuit l'exploitation de ce modèle dans le laboratoire du Professeur ASSENMACHER à l'Université de Montpellier (GABRION et al, 1988).

Parallèlement à ces recherches, le modèle de cultures neuronales a été exploité dans deux autres directions : l'identification de messagers intra-cellulaires et des canaux ioniques impliqués dans la libération de TRH (C. LOUDES et al, sous presse à Brain Research), l'étude de l'ontogénèse des vésicules synaptiques par la visualisation de la synaptophysine (protéine membranaire intégrale des vésicules synaptiques) au cours du développement neuronal (TIXIER-VIDAL et al, en collaboration avec B. WIEDENMANN, Heidelberg, sous presse à Neuroscience).

#### PUBLICATIONS

G.E. PFYFFER, A. FAIVRE-BAUMAN, A. TIXIER-VIDAL, A.W. NORMAN, and C.W. HEIZMANN, (1987) *Developmental and functional studies of parvalbumin and calbindin  $D_{28K}$  in hypothalamic neurons grown in serum-free medium. J. Neurochem.* 49, 442-451.

M. LE DAFNIET, D. GROUSELLE, M. KUJAS, D. BRESSION, A. BARRET, A. TIXIER-VIDAL, and F. PEILLON, (1987) *Evidence of TRH and TRH binding sites in human non-secreting pituitary adenomas. J. Clinical Endocrinol. and Metabolism.* 65, 1014-1019.

A.S. WEISMAN, A. TIXIER-VIDAL, and D. GOURDJI, (1987) *Thyrotropin Releasing Hormone increases the levels of c-fos and  $\beta$ -actin mRNA in GH3/B6*

*pituitary tumor cells. In Vitro, Cellular and Developmental Biology*, 23, n° 8, 585-590.

D. GOURDJI (1987) « Cellules antéhypophysaires ». In « Cultures de cellules animales : méthodologie, application » édité par M. ADOLPHE et G. BARLOVATZ-MEIMOU. Editions I.N.S.E.R.M., pp. 321-333.

C. TOUGARD and A. TIXIER-VIDAL, (1988) *Lactotropes and Gonadotropes. Chapitre sur invitation dans « Physiology of Reproduction » edited by E. KNOBIL and J.D. NEILL, Raven Press, Chapitre 30, pp. 1305-1333.*

J.N. LAVERRIÈRE, A. TIXIER-VIDAL, N. BUISSON, A. MORIN, J.A. MARTIAL, and D. GOURDJI, (1988) *Preferential role of calcium in the regulation of prolactin gene transcription by thyroliberin in GH3 pituitary cells. Endocrinology*, 122, n° 1, 333-340.

A. FAIVRE-BAUMAN, C. LOUDES, A. BARRET, C. PATTE, and A. TIXIER-VIDAL, (1988) *Ontogenesis of peptidylglycyl amidation activity in the mouse hypothalamus in vivo and in serum-free medium cultures. Relation with thyroliberin (TRH) accumulation and release in vitro. Developm. Brain Res.*, 40, 261-267.

J. GABRION, S. PERALDI, A. FAIVRE-BAUMAN, C. KLOTZ, S. GHANDOUR, D. PAULIN, I. ASSENMACHER, and A. TIXIER-VIDAL, (1988) *Characterization of ependymal cells in hypothalamic and choroidal primary cultures. Neurosci.*, 24, 993-1007.

F. DE VITRY, J. CATELON, J. THIBAUT, S. BOURGOIN, and M. HAMON, (1988) *Serotonin as a growth factor for the differentiation of monoaminergic neurons. In « Progress in Catecholamine Research » Alan R. Liss, Inc, pp. 65-70.*

A. TIXIER-VIDAL, (1988) *Le Groupe de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire (Collège de France-U.A. C.N.R.S. 1115) La Lettre des Sciences de la Vie*, n° 15, 3-7.

## CONGRÈS

Conférence I.N.S.E.R.M. « L'antéhypophyse : Aspects Fondamentaux et Pathologiques », 20-24 septembre 1987, Seillac. A. TIXIER-VIDAL, A. MORIN, D. GOURDJI, C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE et J.N. LAVERRIÈRE.

17<sup>e</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, septembre 1987, Lyon. A. TIXIER-VIDAL, D. GROUSELLE, C. LOUDES.

VII<sup>e</sup> Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, 6-8 octobre 1987, Lyon. A. TIXIER-VIDAL et D. GOURDJI.



Symposium International « Cell to Cell Communication in Endocrinology », 8-9 octobre 1987, sur invitation, Florence, Italie, A. TIXIER-VIDAL et N. BRUNET.

Bat-Sheva Seminar on Molecular Approaches to Hormone Action. 25 octobre-3 novembre 1987, Rehovot, Israël, A. TIXIER-VIDAL et D. GOURDJI.

Colloque Franco-Allemand de Neuroendocrinologie, décembre 1987, Bordeaux. A. TIXIER-VIDAL, J.N. LAVERRIÈRE et C. LOUDES.

XIX<sup>e</sup> Rencontre de Méribel, 13-19 mars 1988, Les Arcs, Savoie. F. DE VITRY.

Journées d'Etude en Immunocytochimie, 28-30 janvier 1988, Paris. C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE, R. PICART et E. NASCIUTTI.

Gordon Conference « Prolactin », février 1988, Los Angeles, U.S.A., A. TIXIER-VIDAL.

Symposium Européen sur la Structure et les Fonctions du Cytosquelette, 13-16 avril 1988, Lyon. C. TOUGARD et S. VAN DE MOORTELE.

Deuxième Forum Peptides International, 2-6 mai 1988, Nancy, D. GOURDJI, A. BARRET et D. GROUSELLE.

Colloque Société Française de Microscopie Electronique, 18-21 mai 1988, Lille, E. VILA-PORCILE et R. PICART.

Table Ronde Roussel-UCLAF, « Intracellular Transport and Targeting of Proteins », 19-20 mai 1988, Paris. A. TIXIER-VIDAL, C. TOUGARD et A. MORIN.

#### CO-ORGANISATION DE CONGRÈS

Conférence I.N.S.E.R.M. « L'Antéhypophyse. Aspects Fondamentaux et Pathologiques », septembre 1988, Seillac, A. TIXIER-VIDAL.

Journées d'Etude en Immunocytochimie, 28-30 janvier 1988, Paris, C. TOUGARD.

Deuxième Forum Peptides International, 2-6 mai 1988, Nancy, D. GOURDJI.

#### COURS ET SÉMINAIRES

Enseignement D.E.A. de Physiologie de la Reproduction, Paris VI, décembre 1987 — D.E.A. d'Endocrinologie, Aspects Moléculaires, Cellulaires et Métaboliques, C.H.U. Bicêtre, janvier 1988 — D.E.A. Biologie-Santé, Option Neurosciences, Université de Montpellier, avril 1988, A. TIXIER-VIDAL.

Séminaire, Centre I.N.S.E.R.M. Saint-Antoine, mai 1988, A. TIXIER-VIDAL.

Conférence, Hôpital Cochin, Rencontres d'Endocrinologie-Métabolisme, juin 1988, A. TIXIER-VIDAL.

Séminaire Centre C.N.R.S. d'Ivry, 15 décembre 1987 — Séminaire Association des Endocrinologues et Diabétologues, 24 novembre 1987 — Séminaire dans le cadre du cours de la Chaire du Professeur F. MOREL, Collège de France, 18 mars 1988 — Université Paris VI, Faculté des Sciences, responsabilité du Module de Neuroendocrinologie Cellulaire, 13 heures de cours, avril-mai 1988 — Université Paris VII (Faculté de Médecine Lariboisière-Saint-Louis, cours dans le cadre du certificat C2 de Pharmacologie Endocrinienne, mai 1988 — Ecole Pratique des Hautes Etudes, Enseignement dans le cadre du cycle d'Etude de Pharmacologie-Toxicologie, mai 1988. D. GOURDJI.

Séminaire à l'Unité I.N.S.E.R.M. U270, Marseille, octobre 1987 — Cours dans le cadre de la Formation Permanente du C.N.R.S. sur « Les Méthodes d'Analyse pour l'Etude de l'Architecture Cellulaire », 14-25 septembre 1987, Paris — Présentation orale aux Journées Scientifiques de l'Institut de Biologie du Collège de France, octobre 1987. C. TOUGARD.

Cours dans le cadre du D.E.A. d'Endocrinologie de l'Université Paris VI, 21 avril 1988, C. LOUDES.

Séminaire de recherches dans le cadre du D.E.A. d'Endocrinologie (option « Endocrinologie Cellulaire et Moléculaire ») de l'Université Paris VI, 21 avril 1988. A. FAIVRE-BAUMAN.

#### DISTINCTION

Andrée TIXIER-VIDAL, Directeur de Recherche C.N.R.S. :

Grand Prix scientifique de la Ville de Paris 1987.