

Physiologie cellulaire

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

Le cours de Physiologie cellulaire a été consacré, durant l'année 1988-1989, à la discussion des mécanismes moléculaires qui permettent aux « canaux » et aux « transporteurs » d'assurer au travers des membranes cellulaires la translocation sélective et efficace de très nombreuses espèces chimiques et ioniques. Historiquement, les concepts de « canaux » et de « transporteurs » ont été introduits pour rendre compte de propriétés de perméabilité membranaire qualitativement très différentes selon la nature des méthodes expérimentales mises en œuvre pour les étudier à l'échelle cellulaire.

L'étude électrophysiologique des cellules excitables a démontré, comme on sait, que le potentiel de repos des membranes, tout comme ses variations transitoires — induites ou propagées — résultent toujours de potentiels de diffusion ionique et de flux rhéogéniques d'ions, et sont conditionnés par la présence, au sein de la membrane, de diverses voies de passage ionique par électrodiffusion, chacune caractérisée par une conductance (généralement susceptibles de varier) et une sélectivité (vis-à-vis des espèces ioniques). L'utilisation de méthodes microscopiques a permis et permet d'étudier à l'échelle unitaire les propriétés des canaux ioniques correspondants : un canal donné peut se trouver dans deux (ou plusieurs) états discrets — fermé et ouvert(s). Tout canal peut être défini par une probabilité d'ouverture, une durée moyenne de l'état ouvert, une sélectivité vis-à-vis des différentes espèces ioniques, enfin une conductance unitaire ; pour des concentrations ioniques données et symétriques (de part et d'autre de la membrane), le courant unitaire — donc le flux ionique — varie en général linéairement en fonction de la différence de potentiel appliquée au travers de la membrane (le comportement est ohmique, au moins entre certaines limites de V_m).

Par contre, les études conduites sur des cellules non excitables en faisant appel à l'utilisation de molécules marquées, ont montré que le renouvellement de nombreux composés intracellulaires se produisait grâce à des mécanismes de translocation à travers les membranes tout à la fois électriquement silen-

cieux (non seulement pour les molécules organiques neutres, mais aussi dans le cas de certains électrolytes), saturables et hautement sélectifs. Souvent même, les flux de deux espèces sont couplés l'un à l'autre soit dans la même direction (cotransport) soit en direction opposée (contretransport). Les transporteurs sont donc des constituants intramembranaires qui comportent un (ou plusieurs) site(s) de liaison ; ceux-ci doivent être spécifiques pour le (ou les) substrat(s) transporté(s) et alternativement accessibles par l'une ou l'autre des faces de la membrane. Lorsqu'un couplage entre deux substrats existe, l'une des espèces peut être transportée *contre* son gradient de concentration (transport secondairement actif) s'il existe un gradient chimique favorable suffisant pour l'autre substrat. Ou encore, le transport du substrat peut être primaire-ment actif lorsqu'il est directement couplé au métabolisme énergétique (par exemple par un cycle de phosphorylation-déphosphorylation du transporteur). On voit donc que le concept de transporteur considère les seuls gradients chimiques des substrats, néglige le potentiel électrique transmembranaire, postule la présence de sites de liaison spécifiques des substrats et implique enfin un cycle unitaire de fonctionnement comportant l'interaction et la translocation d'un nombre fixe de molécules du ou des substrat(s) transporté(s). Les propriétés cinétiques observées rappellent celles des enzymes.

S'agissant du mécanisme de fonctionnement des canaux et transporteurs membranaires, le cours a comporté deux parties : dans une première partie, la plus développée, on a examiné jusqu'à quel point les propriétés apparemment différentes de ces deux types de protéines membranaires peuvent s'expliquer dans le cadre général et unificateur des concepts de la « dynamique moléculaire » ; dans la deuxième partie, on a discuté les informations que la détermination de la structure primaire de certaines de ces protéines (réalisée par clonage génétique) permet dès à présent d'obtenir quant à la nature de telle ou telle de leurs propriétés.

Il faut rappeler en effet que si l'étude physiologique des canaux et transporteurs membranaires permet une analyse assez précise et quantitative de leurs propriétés fonctionnelles, elle ne procure — à elle seule — aucun renseignement sur la nature des mécanismes moléculaires qui en sont responsables. Réciproquement, la détermination de la structure primaire des protéines amphiphiles transmembranaires n'est pas aujourd'hui suffisante — à elle seule — pour que l'on sache en déduire la conformation tridimensionnelle précise de la protéine comme cela serait nécessaire pour en expliquer les propriétés.

*

**

La méthode de dynamique moléculaire appliquée aux protéines transmembranaires considère que la voie de passage suivie par les ions perméants au sein de la protéine peut être décrite par un profil énergétique caractéristique comportant des puits (où l'ion peut interagir avec des radicaux ou des charges électriques) séparés par des barrières de potentiel. L'organisation dans

l'espace de la chaîne ramifiée d'atomes qui constitue la protéine ne doit pas être considérée comme un ensemble statique ; elle est au contraire animée, dans les conditions normales de milieu et de température, de multiples mouvements de toute nature (vibration, rotation, glissement, torsion, translation, etc.) dont l'amplitude et surtout la fréquence est extraordinairement différente selon qu'ils concernent des atomes individuels (les fréquences de vibration sont alors de l'ordre de la picoseconde), la rotation de groupes d'atomes (fréquence de la micro à la nanoseconde), le basculement de chaînes latérales aromatiques (de l'ordre de la milliseconde), ou encore les changements conformationnels touchant l'ensemble de la molécule (dont la fréquence peut être très lente). Ce sont d'ailleurs les innombrables fluctuations thermiques de haute fréquence qui rendent possibles les mouvements de plus grande amplitude. Le mouvement d'un ion le long du canal correspond dès lors à une série de sauts, activés thermiquement, par-dessus les barrières de potentiel rencontrées, la probabilité de chaque saut (K') étant déterminée par la hauteur de la barrière d'énergie E correspondante, selon la relation générale

$$K' \approx \exp(-E/k_B T).$$

Dans le cas particulier de la gramicidine, un ionophore à sodium dont la structure peptidique hélicoïdale particulière a été analysée par cristallographie, il a été possible de tester le bien-fondé des prédictions de la méthode de dynamique moléculaire en retrouvant par le calcul une constante de translocation pour le sodium équivalente à celle mesurée expérimentalement.

*

**

Dans le cas des protéines de transport d'ions habituelles dont la structure tridimensionnelle n'est pas connue, la méthode consiste à calculer les propriétés cinétiques de modèles simplifiés comportant au moins un site spécifique d'interaction de l'ion avec le canal (agissant comme filtre de sélectivité) et accessible avec une probabilité donnée (et différente) à partir de l'une et l'autre des faces de la membrane (présence d'une barrière de potentiel de hauteur différente de part et d'autre du site d'interaction). On admet en outre qu'un changement de conformation de la protéine puisse modifier, avec une probabilité définie, la hauteur des barrières de potentiel.

Un tel modèle général présente des propriétés cinétiques de transport ionique très différentes selon les fréquences relatives avec lesquelles se produisent les sauts ioniques et les changements de conformations de la protéine.

Ainsi, lorsque le temps moyen de présence d'un ion sur son site spécifique est très court (de l'ordre de 10^{-8} sec.), alors que la durée de l'état conformationnel correspondant est longue (de l'ordre de la milliseconde), la protéine pourra se comporter comme un canal soit ouvert et traversé par un courant ionique mesurable (une dizaine de pA), soit silencieux (si le site de liaison n'est pas accessible dans l'une des conformations).

A l'inverse, lorsque la fréquence des changements conformationnels est comparable ou plus élevée que celle des sauts ioniques, la protéine pourra se comporter comme un transporteur (diffusion facilitée), surtout si le changement de conformation fait varier en sens inverse la hauteur des barrières de potentiel situées de part et d'autre du site d'interaction. De plus, le transporteur manifestera des propriétés de diffusion par échange et de saturabilité.

On montre ensuite, dans le cas d'un canal rigide, que, si le site de liaison peut fixer deux espèces ioniques i et j différentes, il y aura *interaction* entre les deux substrats (compétition de liaison sur le site), mais pas de couplage entre les flux de i et j (lorsque le gradient électrochimique d'un des ions est nul, son flux net est nécessairement nul). Par contre, une protéine de transport dont le site de liaison est capable de fixer les espèces i et j pourra coupler les flux de ces deux espèces (le gradient chimique de l'une des deux permettant le transport actif de l'autre) à condition a) que cette protéine soit capable de fluctuer rapidement entre deux conformations telles que l'accessibilité du site par les deux faces de la membrane varie dans le même sens (contre transport) ou en sens inverse pour les deux espèces (cotransport). Si la transconformation de la protéine est impossible lorsque le site de liaison est libre, alors le couplage entre les flux nets de i et j est strict (stoechiométrie fixe du contre transport ou du cotransport).

De plus, la méthode de dynamique moléculaire permet d'analyser aussi les propriétés des *pompes ioniques*, c'est-à-dire des transporteurs protéiques dont le cycle conformationnel est couplé à une réaction covalente, par exemple de phosphorylation-déphosphorylation dans le cas des ATPases.

Enfin, cette méthode permet de prendre en compte les effets du potentiel transmembranaire sur le processus de translocation ionique et surtout de prévoir quels devraient être les effets de changements de V_m sur les flux ioniques selon que le voltage affecte préférentiellement la probabilité de liaison de l'ion sur son site, la probabilité de sa dissociation ou encore celles des changements conformationnels.

Toutes ces conditions concernant l'analyse des canaux et transporteurs membranaires par la méthode de dynamique moléculaire ont été étayées au cours par les équations cinétiques minimales correspondantes et confrontées — quand ils étaient disponibles — à des exemples expérimentaux récemment publiés.

*

**

Dans la dernière partie du cours, on s'est attaché à dégager les informations principales touchant les mécanismes moléculaires de translocation d'ores et déjà acquises grâce à l'utilisation des méthodes du génie génétique. Celles-ci concernent d'abord la mise en évidence et le dénombrement des α -hélices hydrophobes transmembranaires dont on a appelé le principe.

Puis, à propos des travaux récemment publiés sur le locus « shaker » de la drosophile, on a indiqué comment 5 transcrits différents du même gène pourraient — en partie par épissage différentiel — permettre l'expression, selon les types cellulaires, de plusieurs types de sous-unités de canaux potassiques. Le canal K^+ fonctionnel étant probablement tétramérique, la combinaison de ces sous-unités permettrait de réaliser un nombre considérable de canaux K^+ de type A (voltage-dépendants) différents, un résultat qui s'accorde avec l'extrême polymorphisme physiologique des conductances potassiques selon les tissus.

D'autre part, le clonage des gènes du canal calcique voltage-dépendant, des canaux sodiques voltage-dépendants du cerveau de rat et de l'organe électrique de la torpille, enfin, très récemment, du protomère de canal potassique voltage-dépendant de la drosophile, a montré que la protéine des canaux calciques et sodiques (250 KD) comporte 4 séquences répétitives principales et homologues (chacune incluant 6 segments hydrophobes transmembranaires). Mais surtout, toutes ces séquences contiennent un court segment hydrophobe de 20 acides aminés environ (segment S4), dont un AA sur trois est un acide aminé basique. La recherche d'homologies dans les banques de données a révélé que des séquences du type du segment S4 n'ont été jusqu'ici rencontrées que dans ces 4 protéines de canaux ioniques. Or, ceux-ci ont en commun d'être tous les 4 voltage-dépendants. On en déduit que ce segment hydrophobe fortement chargé positivement doit probablement être engagé dans l'épaisseur de la membrane et s'y déplacer lorsque le potentiel transmembranaire diminue, ce qui rendrait l'ouverture du canal possible. Cette observation confirme l'hypothèse de Hodgkin et Huxley qui, dès 1952, avaient postulé que l'ouverture des canaux voltage-dépendants devait impliquer le déplacement de charges agissant dans la membrane comme « senseurs » du champ électrique, hypothèse déjà étayée en 1973 par la mise en évidence d'un courant capacitif (gating current) par Armstrong et Bezanilla.

Enfin, à propos des études récemment conduites par Kabak sur la perméase aux β -galactosides de *E. Coli*, les possibilités offertes par la mutagenèse dirigée ont été rapidement évoquées : la substitution sélective de chacun des 4 résidus d'histidine de la molécule de cette perméase par d'autres acides aminés a permis de montrer que le remplacement de l'histidine 322 par une arginine supprime le transport actif mais laisse subsister le flux entrant passif de lactose. L'ensemble des résultats suggère que l'histidine 322, avec le glutamate 325 et l'arginine 302, serait engagée dans un cycle de protonation-déprotonation assurant le couplage entre transport de lactose et transport de protons par la perméase.

On voit donc, en conclusion, que les approches expérimentales que permettent aujourd'hui les techniques de la biologie moléculaire, tout comme les études théoriques de « dynamique moléculaire » — dont les prédictions pourront s'affiner lorsque sera mieux connue l'organisation tridimensionnelle des

protéines de transport — ouvrent les unes et les autres des perspectives prometteuses et complémentaires vers la compréhension des mécanismes moléculaires de translocation des ions à travers les membranes biologiques.

F.M.

PROGRAMME DES SÉMINAIRES

25 novembre : C. BAILLY, D. CHABARDÈS, G. FRIEDLANDER, J.-M. ELA-LOUF : Actions tubulaires des hormones et leurs régulateurs.

6 janvier : G. BAVEREL, J. BASTIN, L. BANKIR : Quelques aspects du métabolisme des cellules tubulaires rénales.

20 janvier : A. TRAUTMAN, J. TEULON, J. MEROT, J. EHRENFELD : Canaux ioniques et conductances membranaires.

3 février : M. BICHARA, M. BIDET, F. MOREL : Acidification de l'urine et régulation du calcium et du pH intracellulaires.

10 février : C. BARLET-BAS, R. RAJERISON, M. BLOT-CHABOT, L. CHEVAL : Régulation intracellulaire et transport des cations alcalins dans les cellules tubulaires rénales.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

I. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ FONCTIONNELLE DE LA NA-K-ATPASE SUR DES SEGMENTS UNIQUES DE NÉPHRON

(L. CHEVAL et A. DOUCET)

Nous avons jusqu'à présent développé des microtechniques permettant d'évaluer l'activité Na-K-ATPasique maximale et le nombre d'unités catalytiques de la Na-K-ATPase au niveau de segments uniques de néphron. Une des limitations majeures de ces techniques réside dans le fait que, dans les conditions physiologiques normales, la pompe ne fonctionne jamais à son V_{max} . Afin de pouvoir étudier des régulations de la pompe qui ne résulteraient pas de modifications de son V_{max} , nous avons développé une microtechnique permettant de quantifier sur des segments intacts de néphron, et dans des conditions physiologiques normales, les flux ioniques couplés au fonctionnement de la Na-K-ATPase. Ceci est réalisé en mesurant la fraction sensible à l'ouabaïne de l'influx de ^{86}Rb (utilisé comme marqueur du potassium) sur des segments uniques de néphron.

Le principe de la technique est le suivant : après leur microdissection à froid, les segments de néphron sont préincubés *in vitro* pendant 10 min à 37 °C, temps suffisant pour rétablir des gradients ioniques transmembranaires

normaux. Après addition d'une quantité traceuse de ^{86}Rb , l'incubation est poursuivie pendant des temps variables à 37 °C. L'arrêt de la réaction se fait par rinçage du tubule à froid dans un milieu contenant de la choline à la place du sodium (pour bloquer la Na-K-ATPase) et du BaCl_2 (pour bloquer les conductances potassiques), conditions dans lesquelles nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de fuite des électrolytes intracellulaires. La radioactivité accumulée dans le tubule est mesurée par scintillation liquide après dissociation des échantillons avec un détergent.

Pour justifier l'utilisation du ^{86}Rb comme marqueur du potassium, nous avons comparé les courbes d'activation de la Na-K-ATPase de tubules perméabilisés en réponse à des concentrations croissantes de KCl et de RbCl. Pour une même structure, les affinités apparentes pour le K^+ et le Rb^+ sont semblables, mais les V_{max} , induits par 5 mM de Rb^+ ou de K^+ respectivement, sont différents, la valeur en RbCl étant toujours inférieure à celle trouvée en KCl. Nous avons donc décidé de poursuivre nos expériences dans un milieu contenant 5 mM de RbCl à la place du KCl, afin que la mesure du flux de traceur à travers la pompe soit un reflet exact de celui de l'entraîneur.

Dans ces conditions nous avons pu vérifier que :

- 1) L'accessibilité du sodium à la face luminale des cellules n'est pas limitante.
- 2) La fraction sensible à l'ouabaine de l'influx de ^{86}Rb est totalement dépendante de la production endogène d'ATP.
- 3) Les flux varient linéairement en fonction de la longueur des échantillons.
- 4) L'influx de ^{86}Rb augmente de façon dose-dépendante et saturable en fonction de la concentration de Rb dans le milieu.
- 5) Les cinétiques d'accumulation du Rb sont saturables. Aux temps courts (30 sec à 1 min), les cinétiques sont quasi linéaires et leur pente est le reflet de la vitesse de fonctionnement de la pompe dans des conditions normales.
- 6) Cette vitesse varie dans les différents segments de néphron proportionnellement au V_{max} de l'activité ATPasique de la pompe.

II. RÉGULATION DU SYSTÈME ADÉNYL CYCLASIQUE TUBULAIRE PAR LES CORTICOSTÉROÏDES

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

L'hypocorticoïdisme induisant une diminution du pouvoir de concentration et de dilution de l'urine, nous avons recherché les éventuels effets des corticostéroïdes sur l'adényl cyclase dans le tubule collecteur et l'anse large ascendante de Henle qui sont le siège respectif de ces deux fonctions.

L'hypocorticoïdisme induit par la surrénalectomie provoque une diminution de l'activité adényl cyclasique sensible à la vasopressine dans l'anse large ascendante et le tubule collecteur. Dans l'anse large ascendante, l'altération n'est pas spécifique de la réponse à la vasopressine, puisque les réponses à toutes les hormones stimulant d'adényl cyclase de ce segment (glucagon, calcitonine) sont inhibées d'un même facteur. Ce résultat est compatible avec l'existence dans l'anse large ascendante d'un seul type cellulaire présentant des récepteurs à ces trois hormones couplés à l'adényl cyclase. Inversement, seule l'activité adényl cyclasique sensible à la vasopressine est altérée dans le tubule collecteur, puisque les réponses au glucagon, à la calcitonine et à l'isoprotérénol ne sont pas modifiées après la surrénalectomie. Ceci indique que le système cyclasique n'est altéré que dans les cellules principales du tubule collecteur, sièges de la réponse à la vasopressine, mais pas dans les cellules intercalaires, sièges des réponses au glucagon, à la calcitonine et à l'isoprotérénol.

Des expériences de complémentation sélective en glucocorticoïdes ou en minéralocorticoïdes réalisées grâce à l'implantation de minipompes osmotiques délivrant en continu de la dexaméthasone ou de l'aldostérone, ont montré que les altérations de l'anse ascendante de Henle et du tubule collecteur sont dues au déficit en glucocorticoïdes et en minéralocorticoïdes, respectivement.

Dans ces deux segments, l'inhibition de l'adényl cyclase observée chez les rats surrénalectomisés ne résulte pas d'une inhibition de l'unité catalytique, puisque la réponse à la forskoline n'est pas affectée, mais d'une altération de la protéine G qui couple les récepteurs hormonaux à la cyclase, puisque les réponses à la toxine cholérique et au fluorure d'aluminium sont inhibées dans le même rapport que la réponse à la vasopressine.

III. RÉGULATION DE L'ACCUMULATION D'AMP CYCLIQUE INTRACELLULAIRE : INHIBITION PAR LA PGE₂ INDÉPENDANTE D'UN EFFET SUR L'ACTIVITÉ ADÉNYL-CYCLASIQUE

(D. CHABARDÈS, M. MONTÉGUT et S. SIAUME-PÉREZ)

La microméthode de dosage radioimmunologique de l'AMP cyclique est utilisée depuis quelques années dans le laboratoire pour étudier l'action inhibitrice éventuelle de différents facteurs vis-à-vis des réponses hormonales observées dans chaque segment du néphron.

Dans nos conditions expérimentales, chaque échantillon de tubule rénal ne représente que de 200 à 400 cellules environ et la production d'AMP cyclique n'est mesurable qu'en présence d'un inhibiteur des phosphodiésterases. Certains de ces inhibiteurs, tels que l'Isobutylmethylxanthine (IBMX), bloquent toutes les activités phosphodiésterasiques capables d'hydrolyser l'AMP cycli-

que ; l'IBMX permet donc d'observer des inhibitions de production d'AMP cyclique dues à la mise en jeu d' α_1 , unité de couplage inhibitrice de l'activité adénylcyclasique.

D'autres bloquants des activités phosphodiésterasiques sont spécifiques d'une classe précise de phosphodiésterase : c'est le cas notamment du R_0 20-1724 qui inhibe l'activité de la phosphodiésterase de type III, mais n'affecte pas celles des phosphodiésterases de type I (modulées par le complexe Ca^{++} -calmodulin) et de type II (modulées par le cGMP cyclique).

Ces deux bloquants, IBMX et R_0 20-1724, ont été utilisés pour étudier l'action inhibitrice éventuelle de la PGE_2 vis-à-vis de la production d'AMP cyclique induite par la vasopressine (AVP) dans le canal collecteur de rat.

En présence d'IBMX, l'addition de PGE_2 ne modifie pas la réponse à l'AVP dans la partie médullaire (MCT) ou corticale (CCT) du canal collecteur. En présence de R_0 20-1724, la réponse à l'AVP du CCT reste inchangée, mais dans le MCT, cette réponse est inhibée de 50 à 70 %. Ce résultat démontrait que, dans le MCT de rat, la PGE_2 n'agissait pas par une inhibition de l'activité adényl-cyclique due à α_1 , contrairement à ce que nous avons précédemment observé dans le canal collecteur de lapin.

L'inhibition observée en présence de R_0 20-1724 suggérait par contre que la PGE_2 pouvait agir sur le métabolisme de l'AMP cyclique induit par l'AVP. Mais la mise en jeu par les prostaglandines d'un facteur intracellulaire tel que l'adénosine pouvait également expliquer un tel résultat : en effet, le R_0 20-1724, contrairement à l'IBMX, ne bloque pas les récepteurs à l'adénosine.

Des expériences complémentaires ont montré que des agonistes spécifiques de l'adénosine, inhibiteurs de l'adénylcyclase dans certaines cellules (agonistes A_1), diminuent effectivement la production d'AMP cyclique dans le MCT de rat. Cependant, cette action est bloquée par des antagonistes des récepteurs A_1 , alors que l'effet de la PGE_2 n'est pas affecté par de tels antagonistes.

De plus, l'addition simultanée de PGE_2 et d'agonistes A_1 , ou celle de PGE_2 et d'agonistes α_2 adrénergiques, induit une inhibition de production d'AMP cyclique plus grande que celle observée avec un seul de ces facteurs. L'analyse détaillée des inhibitions obtenues avec ces agents régulateurs couplés deux à deux montre : 1) que la PGE_2 et les agonistes α_2 adrénergiques ou la PGE_2 et les agonistes A_1 de l'adénosine induisent une inhibition cumulative de l'accumulation d'AMP cyclique induite par l'AVP ; 2) que les agonistes α_2 adrénergiques et A_1 de l'adénosine n'induisent pas d'inhibition cumulative.

Un même type cellulaire sensible à l'AVP dans le canal collecteur de rat est donc contrôlé négativement par trois facteurs : les agonistes α_2 adrénergiques et les agonistes A_1 de l'adénosine qui agissent probablement par un même mécanisme, l'inhibition de l'activité adényl-cyclasique ; le troisième facteur, la

PGE₂, agit par une autre voie, cumulative vis-à-vis d'un même pool d'AMP cyclique avec l'inhibition due à l'unité de couplage α_i , inhibitrice de l'activité adényl-cyclasique.

Le mécanisme d'action de la PGE₂, tant au niveau membranaire qu'intracellulaire, reste à définir.

IV. ONTOGÉNÈSE DES RÉCEPTEURS RÉNAUX DE L'ANP

(D. BUTLEN, B. SEMMEKROT, S. ROSEAU)

Ce problème a été étudié en mesurant la liaison spécifique de (¹²⁵I) α -ANP sur des glomérules et IMCT microdisséqués à partir de reins de jeunes rats âgés de 2 à 35 jours post partum. Chez le jeune comme chez l'adulte : 1) les liaisons totale et non spécifique de radioligand augmentent linéairement en fonction du nombre de glomérules ou de la longueur des IMCT ; 2) sur les deux structures, la liaison spécifique de (¹²⁵I) α -ANP est inhibée de façon dose-dépendante par le ligand non marqué et 3) les sites spécifiques des glomérules et des IMCT montrent les mêmes propriétés de reconnaissance des analogues de l'ANP. Le nombre de récepteurs de l'ANP dans les glomérules et IMCT est très faible juste après la naissance et augmente progressivement en fonction de l'âge, pour atteindre les niveaux adultes correspondants au cours de la 4^e semaine post-natale. (B. Semmekrot, S. Roseau, G. Vassent and D. Butlen, *Mol. Cell. Endocrinol.*, submitted for publication).

Ces études suggèrent que l'absence de réponse polyurique et natriurétique présentée par le très jeune rat à l'administration d'ANP exogène peut s'expliquer par la mise en place progressive au cours de l'ontogenèse post-natale des récepteurs rénaux de l'ANP.

V. PRODUCTION D'URÉE À PARTIR D'ARGININE PAR LE REIN DE RAT

(A. HUS-CITHAREL, en collaboration avec O. LEVILLAIN et L. BANKIR, I.N.S.E.R.M., U 90, Hôpital Necker)

Bien qu'il soit reconnu que le tissu rénal contient de l'arginase, il est toutefois couramment admis que le rein des mammifères ne produit pas d'urée, car le débit d'arginine dans la veine rénale est supérieur à celui de l'artère rénale. Des expériences réalisées récemment par O. Levillain et L. Bankir dans l'U 90 de l'I.N.S.E.R.M. ont cependant montré que des suspensions tubulaires de rein de rat incubées en présence d'arginine marquée au C¹⁴ [L-(guanido-¹⁴C)arginine], sont capables de produire de l'urée marquée par le C¹⁴. Il importait donc de rechercher quels sont les segments du néphron

qui sont responsables de cette uréogénèse en utilisant une microméthode sur segments isolés par microdissection. Les expériences ont été réalisées dans notre laboratoire en incubant des fragments tubulaires des différentes portions du néphron de rat dans 1 μl d'un milieu contenant de l'arginine marquée par ^{14}C , ainsi que de l'uréase pour hydrolyser l'urée éventuellement formée (le CO_2 marqué étant continuellement recueilli par diffusion dans une gouttelette de KOH).

Les résultats obtenus montrent sans ambiguïté que certains segments des néphrons sont le siège d'une uréogénèse, mais pas les autres. Ainsi, dans le tubule proximal, la partie contournée est pratiquement inactive, alors que dans la pars recta on note une production croissante d'urée de la portion corticale ($< 100 \text{ fmoles} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) en direction de la partie médullaire ($250 \text{ fmoles} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Le segment de dilution (segment large ascendant de l'anse de Henle) ne produit d'urée ni dans sa portion médullaire, ni dans sa portion corticale. Enfin, dans les segments terminaux du néphron, on observe une certaine uréogénèse dans la portion corticale du tubule collecteur (environ $50 \text{ fmoles} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), qui s'accroît ensuite lorsqu'on atteint les canaux collecteurs de la médulla interne ($> 100 \text{ fmoles} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Cette distribution particulière des sites de production de l'urée le long du néphron suggère que la production d'urée pourrait être impliquée dans le recyclage intrarénal d'urée par contre-courant et donc dans le mécanisme de concentration de l'urine par le rein. Précisons qu'un calcul approximatif permet de montrer que le taux de production nette d'urée par le rein du rat reste petit (2 à 5 %), par rapport au débit d'urée apportée au rein par voie circulatoire (Ces résultats sont en cours de publication).

Notons encore que la microméthode utilisée permet également d'étudier les segments du néphron qui sont capables de synthétiser de l'arginine : dans ce cas, on introduit comme substrat la citrulline marquée [L-(carbamoyl- ^{14}C) citrulline, en présence d'aspartate] et on ajoute au milieu de l'arginase et de l'uréase. Les résultats préliminaires déjà obtenus sont sans équivoque ; la synthèse d'arginine n'est observée chez le rat que dans le tubule proximal, et davantage dans sa portion contournée ($125 \text{ fmoles} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). A l'exception de la pars recta proximale, les sites de production respective d'arginine et d'urée par le rein sont donc distincts. Et, effectivement, lorsqu'on réalise des expériences utilisant la citrulline marquée comme précurseur, mais sans introduire d'arginase dans le milieu, les seuls échantillons tubulaires qui contiennent du $^{14}\text{CO}_2$ dans cette condition (i.e., qui produisent de l'urée à partir de citrulline), sont ceux de la pars recta du tubule proximal.

Il est projeté de rechercher si l'uréogénèse intrarénale du rat est susceptible de varier en fonction de la teneur du régime alimentaire en protéines et si elle se retrouve chez d'autres espèces comme le lapin, le cobaye ou la souris. Il conviendra également d'établir les propriétés cinétiques de l'arginase rénale — notamment le K_m de son substrat (en utilisant des fragments tubulaires

perméabilisés par des détergents) — afin de préciser quel(s) type(s) d'isoformes de l'enzyme est (sont) présent(s) dans la pars recta et le canal collecteur.

VI. LA PERMÉABILITÉ AU CALCIUM DES CELLULES DE TUBULE COLLECTEUR

(J. MARCHETTI, S. TANIGUCHI et F. MOREL)

Nous avons décrit dans un précédent compte rendu d'activité le dispositif que nous avons mis au point au laboratoire pour mesurer la concentration du calcium ionisé dans les cellules de segments uniques de tubule rénal en enregistrant la fluorescence du fura-2 à l'aide d'un microscope inversé. En résumé, la méthode permet donc de mesurer $[Ca]_i$ en continu (à raison de 10 points par minute) pendant environ deux heures sans que la perte de fura-2 par l'échantillon ne fasse par trop décroître les intensités de fluorescence mesurées.

Les modalités de renouvellement du calcium dans les cellules du tubule collecteur cortical du rein de rat ont été analysées systématiquement grâce à cette approche. Il a été d'abord observé que la concentration du calcium ionisé $[Ca]_i$, reste généralement stable et comprise entre 100 et 150 nM, lorsque le tubule est superfusé avec une solution contenant 1 mM de calcium. Si l'on change brusquement la concentration du calcium externe en cours d'expérience, on note que $[Ca]_i$ varie aussitôt pour atteindre un nouvel état stationnaire selon une courbe exponentielle dont la valeur d'équilibre varie linéairement avec $[Ca]_o$ et la pente indique que le pool du calcium impliqué se renouvelle deux fois par minute. L'analyse des résultats suggère que le calcium ionisé du cytoplasme (ainsi que le calcium lié du cytosol en équilibre avec lui), s'échange avec le calcium extracellulaire par l'intermédiaire de deux mécanismes principaux : a) un flux entrant passif de calcium à travers la membrane (apicale) des cellules et dont l'intensité est proportionnelle à $[Ca]_o$ et au voltage membranaire V_m ; b) un flux sortant de calcium par transport actif (Ca^{2+} -ATPase) à travers la membrane périrtubulaire des cellules et dont l'intensité est proportionnelle à tout instant à la concentration $[Ca]_i$. L'entrée passive observée ne résulte pas de la présence apicale de canaux calciques voltage-dépendants, puisque la dépolarisation des cellules par addition de potassium à l'extérieur ne produit pas d'augmentation, mais au contraire une baisse de $[Ca]_i$ compatible avec l'existence de canaux calciques dont la probabilité d'ouverture est indépendante du voltage. De plus, dans les conditions normales, il ne semble pas qu'un mécanisme de contre-transport Na/Ca participe aux échanges de calcium, puisqu'aucune variation nette de $[Ca]_i$ ne se produit lorsqu'on abaisse le sodium externe $[Na]_o$ de 160 à 25 mM (Taniguchi et al. 1989).

VII. MISE EN ÉVIDENCE D'UN ÉCHANGEUR Na/Ca DANS LES CELLULES DU TUBULE COLLECTEUR

(J. MARCHETTI, S. TANIGUCHI et F. MOREL)

Des expériences récentes ont montré cependant qu'un système de contre-transport Na^+/Ca^+ doit exister dans ces cellules. En effet, si l'on abaisse $[\text{Na}]_o$ comme ci-dessus non plus sur des tubules collecteurs de rats normaux, mais de rats surrénalectomisés (ADX), alors on obtient une augmentation immédiate, et prononcée, bien que transitoire, de $[\text{Ca}]_i$. Cette réponse pourrait résulter de la diminution importante d'activité de la $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase qu'entraîne la surrénalectomie sur ce segment, ainsi que de l'augmentation de $[\text{Na}]_i^+$ qui lui est associée. Pour tester cette hypothèse, les effets de l'ouabaïne ont été recherchés, en raison de son action inhibitrice sur la $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase. L'application d'ouabaïne seule ne fait pas augmenter $[\text{Ca}]_i$. Par contre, sur des tubules prétraités par l'ouabaïne, la baisse de $[\text{Na}]_o$ induit effectivement une augmentation marquée et transitoire de $[\text{Ca}]_i$, analogue à celle obtenue sur les CCT de rats ADX.

L'augmentation de $[\text{Ca}]_i$ induite par une baisse de $[\text{Na}]_o$ sur des segments prétraités à l'ouabaïne est relativement spécifique du canal collecteur, puisqu'elle se retrouve dans sa portion médullaire, alors qu'elle est absente, par contre, dans le tubule proximal par exemple.

Ajoutons que cette réponse transitoire du CCT ne se produit plus en l'absence de calcium extracellulaire, ni si la solution de basse concentration de sodium est appliquée d'abord et l'ouabaïne ensuite. On en déduit que l'effet de l'ouabaïne s'exerce par l'intermédiaire de l'augmentation de $[\text{Na}]_i$ qui résulte de son action sur la $(\text{Na-K})\text{ATPase}$, et que l'augmentation de $[\text{Ca}]_i$ correspond à l'entrée de calcium extracellulaire.

Ces résultats suggèrent donc la présence d'échangeurs Na/Ca dans les membranes des cellules du CCT ; un flux net entrant de calcium (et sortant de Na) serait déclenché à travers l'échangeur lorsque le gradient de concentration du sodium est supprimé (ou même inversé) en faisant augmenter $[\text{Na}]_i$ par l'ouabaïne puis baisser brutalement $[\text{Na}]_o$ (de 164 à 27 mM) par substitution de la solution externe. Le caractère transitoire de la réponse s'explique si l'on considère que $[\text{Na}]_i$ doit diminuer progressivement après l'application de la solution externe pauvre en sodium, même en présence d'ouabaïne, en raison de la réduction du flux de sodium entrant dans la cellule par les canaux sodiques apicaux amiloride sensibles. Cette interprétation suppose, d'une part, que la concentration du sodium dans les cellules des canaux collecteurs augmente en réponse à l'application d'ouabaïne, et, d'autre part, que lorsqu'on abaisse $[\text{Na}]_o$, la concentration intracellulaire diminue à son tour, et ceci non seulement dans les tubules témoins, mais également dans les tubules traités à l'ouabaïne et, pour ces derniers, avec un décalage temporel compatible avec celui de la courbe de calcium intracellulaire.

Ces présupposés ont été confirmés par R. Rajerison et M. Faure en mesurant les concentrations intracellulaires de Na^+ et K^+ dans des segments microdisséqués de tubules collecteurs grâce à la microméthode de photométrie de flamme mise au point au laboratoire. Les résultats suivants ont été obtenus ($[\text{Na}]_i$, valeur moyenne en mM par litre de volume cellulaire) : tubules collecteurs incubés en présence de 164 mM de sodium extracellulaire $[\text{Na}]_i = 21.6$ mM ; 3 et 15 min après transfert dans une solution contenant 27 mM de sodium, $[\text{Na}]_i = 8.8$ et 9.7 mM respectivement - Tubules collecteurs incubés pendant 5 min en présence de 164 mM de $[\text{Na}]_o$ plus 1 mM d'ouabaine, $[\text{Na}]_i = 57$ ml) ; tubules traités à l'ouabaine, 3 et 15 minutes après transfert dans une solution contenant 1 mM d'ouabaine et 27 mM de $[\text{Na}]_o$, $[\text{Na}]_o = 29$ et 21 mM respectivement. On voit que ces résultats sont compatibles avec le mécanisme proposé.

Il fallait aussi s'assurer que les variations de $[\text{Ca}]_i$ observées dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus ne seraient pas la conséquence indirecte d'un effet primaire exercé par le gradient de sodium (via un échangeur Na^+/H^+) sur le pH intracellulaire. Là aussi, des expériences de contrôle ont été effectuées au laboratoire par G. Dagher et C. Sauterey en mesurant en continu le pH intracellulaire (pH_i) de tubules collecteurs microdisséqués uniques par enregistrement de la fluorescence du BCECF selon une microméthode récemment adaptée par eux. Les applications d'ouabaine (pendant 5 min), puis d'une solution de bas sodium (27 mM) contenant de l'ouabaine sont restées sans effet décelable sur la valeur du $[\text{pH}]_i$ de CCT préalablement chargés de BCECF. On en déduit que l'échangeur Na/H du tubule collecteur n'est pas activé dans les conditions qui, par ailleurs, provoquent l'entrée nette de calcium, ce qui conforte l'hypothèse qu'un échangeur Na/Ca est impliqué.

L'étude théorique réalisée par Läuger (1986) grâce à la méthode de dynamique moléculaire montre que le flux net de calcium à travers l'échangeur Na/Ca (modèle consécutif minimum avec une stoechiométrie de 3/1) n'est nullement proportionnel au potentiel électrochimique global (V_t) qui s'exerce sur l'échangeur, mais, par contre, augmente de façon coopérative avec $[\text{Na}]_i$. L'observation, a priori paradoxale, que la diminution de $[\text{Na}]_o$ (qui induit pourtant une « driving force » initiale (V_t) de 120 V environ), ou encore la seule application d'ouabaine (qui en induit une de plus de 90 mV) soient l'une et l'autre sans effet sur $[\text{Ca}]_i$, alors que leur association (à laquelle correspond une V_t de 230 à 240 mV) provoque une brusque montée de $[\text{Ca}]_i$, s'explique parfaitement par ces propriétés non linéaires de l'échangeur Na/Ca ; de même, la dépendance de l'échangeur vis-à-vis de $[\text{Na}]_i$ explique la baisse progressive de $[\text{Ca}]_i$ (i.e., la baisse du flux entrant de calcium par l'échangeur consécutive à son pic initial). Ces résultats sont en cours de publication (Taniguchi, Marchetti et Morel, soumis).

BIBLIOGRAPHIE

D. BUTLEN, F. MOREL and S. VADROT. *Characterization of insulin receptors along the rat nephron* (Réunion Commune Physiological Society et Assoc. des Physiologistes, Paris 1-2 juillet 1988, Abstr. C.131, 137P).

M. FAURE and R.M. RAJERISON. *Effects of NH_4^+ on cell Na^+ contents of medullary thick ascending limb (MAL) isolated from collagenase* (Réunion Commune Physiological Society et Assoc. des Physiologistes, Paris 1-2 juillet 1988, Abstr. C.116, 122P).

F. MOREL. *Régulation hormonale du fonctionnement rénal. 2^e Colloque d'Animation de la Recherche I.N.S.E.R.M. In : Communication cellulaire et Pathologie. Ed. C. KORDON and L. LEGROS (I.N.S.E.R.M. J. Libbey, pp. 19-21, 1988).*

R.M. RAJERISON, M. FAURE and F. MOREL. *Involvement of Na and Cl in ouabain-induced cell swelling in thick ascending limb of rat kidney* (Pflügers Arch. 412 : 491-496, 1988).

R. RAJERISON, M. FAURE and F. MOREL. *Relationship between cell volume and cation content in thick ascending limb of rat kidney* (Pflügers Arch. 412 : 497-502, 1988).

D. BUTLEN, S. VADROT, S. ROSEAU and F. MOREL. *Insulin receptors along the rat nephron : [^{125}I] Insulin binding in microdissected glomeruli and tubules* (Pflügers Arch. 412 : 604-612, 1988).

F. MOREL and A. DOUCET. *Hormonal control of Na-K-ATPase. Hormones and Cell Regulation. N° 12, Eds. J. NUNEZ, J.E. DUMONT, E. CARAFOLI* (Colloque I.N.S.E.R.M./John Libbey, London. 165 : 13-30, 1988).

D. CHABARDES, C. BRICK-GHANNAM, M. MONTEGUT and S. SIAUME-PEREZ. *Effect of PGE_2 and α -adrenergic agonists on AVP-dependent cAMP levels in rabbit and rat CCT* [Am. J. Physiol. 255 (Renal Fluid Electrol. Physiol. 24) : F43-F48, 1988].

D. CHABARDES and M. MONTEGUT. *Vasopressin (AVP)-stimulated cAMP level is inhibited by different ways in the rat medullary collecting tubule (MCT) : role of PGE_2* (Kidney Int. 35 : 494, 1988, Abstr.).

N.M. GRIFFITHS, D. CHABARDES, M. IMBERT-TEBOUL, S. SIAUME-PEREZ, F. MOREL and N.L. SIMMONS. *Distribution of vasoactive intestinal peptide-sensitive adenylate cyclase activity along the rabbit nephron* (Pflügers Arch. 412 : 363-368, 1988).

A. DOUCET. *Multiple hormonal control of the Na/K-ATPase activity of the thick ascending limb* (Dans : Nephrology, ed. A.M. Davison, Baillière Tindall, Londres, 1988, pp. 247-254).

A. DOUCET. *Function and control of Na-K-ATPase in single segments of the mammalian kidney* (Kidney Int. 34 : 749-760, 1988).

C. BARLET-BAS and A. DOUCET. *Aldosterone and sodium induce kidney Na-K-ATPase in vitro by two different mechanisms* (Dans : The Na⁺, K⁺-pump, Part B : Cellular aspects, ed. J.C. Skon, Alan R. Liss, New York, 1988, pp. 339-344).

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. USA, 85 : 1707-1711, 1988).

P. PRADELLES, J. GRASSI, D. CHABARDES and N. GUISE. *Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate and guanosine cyclic 3', 5'-monophosphate using acetylcholinesterase* (Anal. Chem. 61 : 447-453, 1989).

EXPOSÉS, MISSIONS, CONGRÈS ET STAGES

M. F. MOREL a été l'un des organisateurs du XIII^e Symposium sur « Les Hormones et la Régulation Cellulaire » (Mont Ste-Odile, octobre 1988) ; il a présidé une séance à la Réunion Commune de la Physiological Society et de l'Association des Physiologistes au Collège de France en juillet 1988, réunion à laquelle R. RAJERISON et D. BUTLEN ont présenté des Communications.

D. BUTLEN et A. DOUCET ont effectué l'un et l'autre des Missions au Maroc, comportant des exposés scientifiques et des enseignements aux étudiants de 3^e cycle.

D. BUTLEN, Sous-Directeur du laboratoire, a suivi le stage de formation de la personne compétente en radioprotection et a obtenu l'habilitation correspondante.

ENSEIGNEMENT

Différents chercheurs du laboratoire ont participé à des enseignements de 2^e et 3^e cycle : C. BARLET-BAS au Magistère de Biologie, ainsi qu'à la préparation à l'Agrégation des Sciences Naturelles (Paris 6) ; A. DOUCET à la Maîtrise de Biologie cellulaire de Paris 7 et au DEA de Pharmacologie ; D. CHABARDES à la Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales (Hôpital Tenon). Enfin, et pour 4 à 8 heures chacun, D. BUTLEN, A. DOUCET, R. RAJERISON et F. MOREL aux DEA de Physiologie et Physiopathologie rénales.

DIPLOMES

M. C. KHADOURI a passé sa Thèse de Docteur ès Sciences.

DISTINCTIONS

M. F. MOREL a été fait Docteur Honoris Causa de l'Université de Montréal.

M^{me} C. BARLET-BAS a reçu le Prix d'Endocrinologie 1988 de la Fondation pour La Recherche Médicale.

GROUPE DE NEUROENDOCRINOLOGIE CELLULAIRE
ET MOLÉCULAIRE — U.R.A. C.N.R.S. 1115
Responsable : M^{me} A. TIXIER-VIDAL, Directeur de Recherche C.N.R.S.

RAPPORT D'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE
Juin 1988 - Juin 1989

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 SÉCRÉ-
TION DE PROLACTINE*

Les travaux publiés au cours de l'année se situent dans le contexte de nos recherches sur l'aspect « pléiotypique » du processus sécrétoire de la prolactine que nous abordons à ses différents niveaux d'organisation, depuis l'expression des gènes jusqu'aux structures intégrées de la cellule et aux membranes basales du tissu antéhypophysaire.

Les études relatives à l'expression coordonnée de gènes, conduites par le groupe de D. GOURDJI (J.N. LAVERRIERE, N. BUISSON, A. WEISMAN), utilisent le modèle sélectionné depuis plusieurs années : l'interaction d'un neuro-peptide, la thyrolibérine (TRH) avec un modèle homogène de cellules cibles, le clone GH3B6 de cellules à prolactine de rat. Les étapes initiales (sites de liaison du TRH, catabolisme des phosphatidyl inositol, augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire) et terminales (libération d'un compartiment préformé de prolactine, stimulation de la transcription du gène et de la synthèse de prolactine) de cette interaction sont bien établies. En outre, le groupe a montré en 1987 (WEISMAN et al) que le TRH induit un accroissement précoce et transitoire des ARNm de l'oncogène c-fos, spécifiquement et dans des cellules quiescentes. Le rôle éventuel sur l'expression des ARNm c-fos de messagers intracellulaires induits par l'occupation des sites TRH a ensuite été recherché et comparé aux effets observés sur les ARNm PRL. Les résultats montrent que l'expression de ces deux gènes est contrôlée par des mécanismes communs dépendant à la fois de l'activation de la protéine kinase C et de la concentration cytosolique du calcium (WEISMAN et al, 1988, GOURDJI et al, 1988). On recherche maintenant si l'activation transitoire de c-fos est corrélée plus précisément avec l'un des deux effets du TRH sur la sécrétion de prolactine, soit la libération du stock préformé, soit la stimulation de la synthèse. Enfin, l'expression coordonnée d'un autre gène impliqué dans le processus sécrétoire et codant pour la sécrétogranine I (composant de la matrice des grains de sécrétion), est actuellement étudiée par J.N. LAVERRIERE.

Dans le cadre des recherches conduites dans le groupe de C. TOUGARD sur le rôle et la régulation de composants de la membrane basale antéhypophysaire, des résultats nouveaux ont été publiés en ce qui concerne la laminine dont E. VILA-PORCILE avait montré précédemment qu'elle est un composant majoritaire des membranes basales antéhypophysaires et qu'elle est vraisemblablement élaborée par les cellules glandulaires. N. BRUNET DE CARVALHO (BRUNET DE CARVALHO et al, 1988) a montré que la laminine est un facteur d'attachement à action lente, solide et durable pour les cellules antéhypophysaires cultivées en absence de sérum et ceci aussi bien pour les cellules clonales GH3B6 que pour les cellules antéhypophysaires normales. En outre, la laminine induit, dans le cas des cellules GH3B6, la formation de longs prolongements uni- et bipolaires dont le nombre et la longueur sont amplifiés par le traitement continu au TRH. Ces effets morphologiques sont couplés à une augmentation significative de la production de prolactine mesurée dans les conditions basales et en présence de TRH. Une étude plus fine de ces phénomènes, notamment en ce qui concerne le processus sécrétoire et l'intervention du cytosquelette, fait l'objet d'un manuscrit sous presse. Dans le même contexte, mais s'adressant au tissu hypophysaire normal, E. VILA-PORCILE (VILA-PORCILE et al, 1988) a comparé la distribution subcellulaire

(immunocytochimie ultrastructurale) de la laminine et de la prolactine dans un modèle physiologique très bien caractérisé : la ratte lactante sacrifiée dans diverses conditions de stimulation (têtée) ou d'inhibition (retrait de la portée). Les résultats mettent en évidence une redistribution de la prolactine en fonction de l'activité sécrétoire avec notamment une accumulation importante dans les citernes du reticulum rugueux et dans les compartiments golgiens, lorsque la sécrétion est bloquée. Au contraire, la distribution intracellulaire de la laminine n'est pas significativement modifiée, suggérant une indépendance des mécanismes contrôlant l'exportation de ces deux protéines.

Enfin, dans le cadre de notre collaboration avec A. NEMESKERI du laboratoire du Professeur B. HALASZ (Faculté de Médecine, Budapest), une étude expérimentale de l'ontogénèse des cellules à prolactine a été conduite chez le Rat. Elle montre l'apparition précoce des cellules à prolactine (15^e jour fœtal) et conclut à l'autodifférenciation de ces cellules qui peut s'effectuer en absence de contrôle hypothalamique ou hormonal.

II. DÉVELOPPEMENT DES CELLULES HYPOTHALAMIQUES DE SOURIS

Les travaux publiés cette année sont relatifs aux deux axes de recherche développés parallèlement sur ce thème : 1. développement précoce et diversification des lignées neuronales et gliales, 2. différenciation terminale des neurones hypothalamiques.

F. DE VITRY a mis en œuvre les techniques d'hybridation *in situ* appliquées à des cellules nerveuses en culture pour situer dans le temps l'apparition de messagers spécifiques et la comparer à celle de la protéine correspondante. En ce qui concerne l'anhydrase carbonique II, spécifique de la lignée oligodendrocytaire, elle a montré que, dans l'hypothalamus, l'apparition des transcrits est très précoce (12^e-13^e j. fœtal) et précède de 4-5 jours celle de la protéine. Ceci suggère la précocité de la différenciation des lignées gliales dans l'hypothalamus (DE VITRY et al, 1989). Un travail analogue a été conduit à l'aide d'une sonde dirigée contre la protéine filamenteuse acide spécifique de la lignée astrocytaire (GFAP). Cette sonde, dirigée contre la GFAP humaine et isolée dans le laboratoire de J. MALLET, croise avec le cDNA de la protéine de souris. Les résultats publiés montrent une co-distribution de la protéine et des transcrits dans les prolongements des astrocytes fibreux différenciés en culture (RATABOUL et al, 1988).

Dans le cadre d'une collaboration avec plusieurs laboratoires (français et russe) (UGRUMOV et al, 1988), des données immunocytochimiques précises et fines ont été publiées sur l'ontogénèse des structures catécholaminergiques dans l'hypothalamus du rat. Elles montrent notamment la précocité de la mise

en place des neurones intrinsèques et des fibres afférentes, à tyrosine hydroxylase : dès le 13^e jour fœtal.

En ce qui concerne la différenciation terminale des neurones hypothalamiques, plusieurs résultats originaux ont été publiés par le groupe d'Annie FAIVRE-BAUMAN concernant la maturation fonctionnelle des neurones à TRH, effectuant leur développement *in vitro* en milieu chimiquement défini. Les neurones prélevés au 16^e jour fœtal, cultivés pendant 6 jours, sont capables d'incorporer des acides aminés précurseurs dans du TRH identifié biochimiquement et immunologiquement dans les cellules et dans le milieu. Cette capacité précède l'apparition des synapses qui intervient vers 10-12 jours. On observe alors une baisse de l'activité spécifique consécutive à un accroissement du compartiment de stockage. Plusieurs stimuli capables d'augmenter le contenu en TRH des cellules ou du milieu induisent en même temps une baisse de sa radioactivité spécifique, ce qui suggère que ces régulations affectent préférentiellement la maturation d'un précurseur préformé (LOUDES et al, 1989). Les mécanismes intracellulaires impliqués dans la libération basale et stimulée du TRH ont été analysés parallèlement dans le même modèle de culture. Deux types de mécanismes peuvent induire la libération du TRH : activation de la protéine kinase C, ouverture de deux types (L et N) de canaux Ca²⁺ dépendant du voltage. En outre, l'ontogénèse de ces mécanismes n'est pas synchrone, l'activation par le BAY/K 8644 étant seule observée avant la formation des synapses (LOUDES et al, 1988).

Les mécanismes cellulaires responsables de la formation des synapses ont été analysés au cours du développement neuronal en culture, à l'aide d'un outil immunologique spécifique d'une protéine membranaire intégrale des vésicules synaptiques : la synaptophysine, ou P38, précédemment caractérisée et clonée par B. WIEDENMANN et coll. à Heidelberg. Dans le cadre d'une collaboration avec ce groupe, nous avons localisé cette protéine par immunocytochimie au cours de la période de synaptogénèse, qui s'étend sur une période de 10-12 jours dans nos conditions. La synaptophysine est détectée très précocement et sélectivement dans un compartiment golgien tardif de neurones immatures. Elle est ensuite libérée de la zone golgienne sous une forme vésiculaire et est transportée jusqu'aux boutons terminaux et aux synapses par un mécanisme qui exige l'intégrité des microtubules. La dépolymérisation de ceux-ci par le nocodazole provoque en effet une rétention et une accumulation de membranes dans la zone golgienne des neurones matures (TIXIER-VIDAL et al, 1988). Les recherches se poursuivent sur la régulation du trafic membranaire neuronal et l'identification de différentes voies intracellulaires de transport vésiculaire.

PUBLICATIONS

C. LOUDES, A. FAIVRE-BAUMAN, C. PATTE and A. TIXIER-VIDAL, *Involvement of protein kinase C and DHP voltage sensitive calcium channels in thyroliberin release by developing hypothalamic neurons in culture (Brain Res., 456, 324-332, 1988).*

N. BRUNET DE CARVALHO, R. PICART, and A. TIXIER-VIDAL, *Interaction of pituitary prolactin cells with extracellular matrix components.* (International Symposium on Cell to Cell Communication in Endocrinology. Serono Symposia Publications, F. Piva, C.W. Bardin, G. Forti, M. Motta, eds, Raven Press, vol. 49, pp. 91-104, 1988).

A. WEISMAN, A. TIXIER-VIDAL and D. GOURDJI, *c-fos and β -actin gene expression is regulated by thyrotropin releasing hormone and serum in GH3/B6 pituitary tumor cells (Proceedings of the Third International Congress on Hormones and Cancer (Hambourg, septembre 1987), Progress in Cancer Research and Therapy, F. Bresciani, R.J.B. King, M.E. Lippman and J.P. Raynaud, eds. Raven Press, volume 35, pp. 118-121, 1988).*

G. ALONSO, P. SIAUD, C. FAIVRE-SARRAILH, D. GROUSELLE, G. BARBANEL and I. ASSENMACHER, *Axons containing a prolactin-like peptide project into the perivascular layer of the median eminence : an immunocytochemical light and electron microscope study in adult and infant rats (Neuroendocrinology, 48, 39-44, 1988).*

A. NEMESKERI, D. GROUSELLE, A. TIXIER-VIDAL and B. HALASZ, *Ontogeny of prolactin synthesizing cells in fetal and early postnatal rat pituitary. In vivo and in vitro studies (In « Prolactin gene family and its receptors. Molecular biology to clinical problems », K. Hoshino, ed., Elsevier Science Publishers, B.V. (Biomedical Division). Excerpta Medica, International Congress Series 819, 319-325, 1988).*

A. TIXIER-VIDAL, N. BRUNET DE CARVALHO, S. VAN DE MOORTELE and C. TOUGARD, *Cellular mechanisms of prolactin secretion. An overview (In « Prolactin gene family and its receptors. Molecular biology to clinical problems », K. Hoshino, ed. Elsevier Science Publishers, B.V. (Biomedical Division). Excerpta Medica, International Congress Series 819, pp.199-209, 1988).*

D. GOURDJI, J.N. LAVERRIERE, A. WEISMAN, N. BUISSON and A. TIXIER-VIDAL, *Coordinate expression of genes in relation with prolactin secretion. (In « prolactin gene family and its receptors. Molecular Biology to clinical problems », K. Hoshino, ed. Elsevier Science Publishers, B.V. (Biomedical Division). Excerpta Medica, International Congress Series 919, pp. 227-235, 1988).*

A. TIXIER-VIDAL, A. FAIVRE-BAUMAN, R. PICART and B. WIEDENMANN, *Immunoelectron microscopic localization of synaptophysin in a Golgi subcompartment of developing hypothalamic neurons (Neurosci., 26, 847-861, 1988).*

E. VILA-PORCILE, R. PICART, L. OLLIVIER, A. TIXIER-VIDAL and C. TOUGARD, *Subcellular distribution of laminin and prolactin in stimulated and*

blocked prolactin cells in the pituitary of lactating rats (Cell Tissue Res., 254, 617-627, 1988).

P. LEGENDRE, A. TIXIER-VIDAL, J.L. BRIGANT and J.D. VINCENT, *Electrophysiology and ultrastructure of mouse hypothalamic neurons in culture : a correlative analysis during development (Developm. Brain Res., 43, 273-285, 1988).*

P. RATABOUL, N. FAUCON BIGUET, P. VERNIER, F. DE VITRY, S. BOULARAND, A. PRIVAT and J. MALLET, *Identification of a human glial fibrillary acidic protein cDNA : a tool for the molecular analysis of reactive gliosis in the mammalian central nervous system. (J. Neurosci. Res., 20, 165-175, 1988).*

C. LOUDES, A. BARRET, A. TIXIER-VIDAL and A. FAIVRE-BAUMAN, *Thyroliberin (TRH) biosynthesis by hypothalamic cells in serum-free medium cultures. (Neurochem. Int., 14, 35-41, 1989).*

F. DE VITRY, D. GOMES, P. RATABOUL, S. DUMAS, J. HILLION, J. CATELON, J.P. DELAUNOY, A. TIXIER-VIDAL and P. DUPOUEY, *Expression of carbonic anhydrase II gene in early brain cells as revealed by in situ hybridization and immunohistochemistry. (J. Neurosci. Res., 22, 120-129, 1989).*

M.V. UGRUMOV, J. TAXI, A. TIXIER-VIDAL, J. THIBAUT and M.S. MITSKEVICH, *Ontogenesis of tyrosine hydroxylase-immunopositive structures in the rat hypothalamus. An atlas of neuronal cell bodies. (Neurosci., 29, 135-156, 1989).*

M.V. UGRUMOV, A. TIXIER-VIDAL, J. TAXI, J. THIBAUT and M.S. MITSKEVICH, *Ontogenesis of tyrosine hydroxylase-immunopositive structures in the rat hypothalamus. Fiber pathways and terminal fields. (Neurosci., 29, 157-166, 1989).*

C. TOUGARD et R. PICART, *Immunocytochimie avant inclusion : tissus, cellules en culture. In : « Immunocytochimie » Méthodes pratiques, p. 5-15. Edité par A. Calas, P. Gounon, D. Hernandez-Verdun, G. Nicolas, M. Reynes et C. Tougard (1989).*

CONGRÈS

V International Symposium on Prolactin, Kyoto, Japon, juillet 1988, D. GOURDJI et A. TIXIER-VIDAL.

VIIIth International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japon, juillet 1988. D. GOURDJI et A. TIXIER-VIDAL.

4^e Congrès International de Biologie Cellulaire, Montréal, Canada, 14-19 août 1988. C. TOUGARD et L.E. NASCIUTTI.

11th Meeting of the European Neuroscience Association, Zurich, septembre 1988. A. TIXIER-VIDAL, A. FAIVRE-BAUMAN et C. LOUDES.

Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Rennes, 6-8 septembre 1988. D. GOURDJI.

Meeting of the European Tissue Culture Society, Gand, Belgique, septembre 1988. A. TIXIER-VIDAL, D. GOURDJI, E. ROSENBAUM.

Autumn School of The European Training Program in Brain and Behaviour Research « Genetic and Epigenetic Control of Phenotypic Expression in Nerve cells », Santa Maria Ligura, Italie, septembre 1988. A. TIXIER-VIDAL.

Workshop « How do we listen to prolactin secreting cells », Bruxelles, Belgique, 6 octobre 1988. C. TOUGARD et J.N. LAVERRIERE.

Conférence Jacques Monod « Cellular and Molecular Biology of Development — Cellular and Molecular Aspects of the Early Events in Neurogenesis ». Roscoff, France, octobre 1988. F. DE VITRY.

Conférence I.N.S.E.R.M. « Systèmes Adhésifs et Fonctions Cellulaires », Seillac, 2-6 octobre 1988. N. BRUNET DE CARVALHO.

Congrès de la Société de Biologie Cellulaire de France. « La transmission des signaux de la surface cellulaire au noyau ». Paris, 20-21 octobre 1988. C. TOUGARD, N. BRUNET DE CARVALHO, F. DE VITRY, D. GOURDJI.

XII^e Conférence en Neurobiologie, Gif-sur-Yvette, décembre 1988. F. DE VITRY.

XIX^e Rencontre de Méribel, Les Arcs, mars 1989. F. DE VITRY.

Journées Franco-Allemandes de Neuroendocrinologie, Walberberg (Cologne) R.F.A., avril 1989. A. TIXIER-VIDAL, C. TOUGARD.

3^e Colloque National des Neurosciences, Montpellier, mai 1989, J. CATELON, J. HILLION, D. GOURDJI, J.N. LAVERRIERE.

Colloque Beckman sur les Oncogènes. Paris, 12 mai 1989, D. GOURDJI.

32^e Symposium International H.P. KLOTZ « Tumeurs sécrétant des hormones peptidiques », Paris, mai 1989, A. TIXIER-VIDAL, C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE, N. BRUNET DE CARVALHO.

1^{er} Colloque de la Société Française de Cultures de Tissus et de Cellules, Paris, juin 1989. A. TIXIER-VIDAL, D. GOURDJI, F. DE VITRY, C. TOUGARD, N. BRUNET DE CARVALHO, A. MORIN, J.N. LAVERRIERE, A. MORIN.

ORGANISATION DE CONGRÈS

Symposium de Neuroendocrinologie « Early Development of Neuroendocrine Mechanisms » dans le cadre du 11^e Congrès E.N.A., Zurich, Suisse, septembre 1988. A. TIXIER-VIDAL.

Membre du Comité Scientifique International du Vth Congress on Prolactin, Kyoto, Japan, juillet 1988. A. TIXIER-VIDAL.

CO-ORGANISATION DE CONGRÈS

Réunion annuelle de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Rennes, septembre 1988. D. GOURDJI.

Atelier I.N.S.E.R.M. : Approche pratique de la microscopie électronique en biologie moléculaire, Paris, 16-17 mars 1989, C. TOUGARD.

1^{re} réunion de la Société Française de Culture de Tissus et de Cellules, Paris, 2 juin 1989, D. GOURDJI.

SÉMINAIRES ET CONFÉRENCES

Department of Cell Biology, Medical School, U.C., San Francisco, et Department of Physiology-Anatomy, U.C. Berkeley, U.S.A., juillet 1988. A. TIXIER-VIDAL.

Max Plank Institut für Endokrinologie, Hanovre, Allemagne, avril 1989. A. TIXIER-VIDAL.

Département de Physiologie de la Reproduction, I.N.R.A., Nouzilly, avril 1989. A. TIXIER-VIDAL.

Département de Pharmacologie, Université de Louvain, mai 1989. A. TIXIER-VIDAL.

ENSEIGNEMENT

D.E.A. de Physiologie de la Reproduction, Paris VI, 1989, D.E.A. d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire, C.H.U., Bicêtre. A. TIXIER-VIDAL.

Module de Neuroendocrinologie Cellulaire (totalité de l'enseignement magistral, mars 1989 à mai 1989) (Maîtrise de Neurobiologie Cellulaire, Université de Paris VI, Faculté des Sciences). Deux cours dans le cadre du certificat de Pharmacologie Endocrinienne, mars 1988, Université Paris VII, Faculté de Médecine, Saint-Louis. D. GOURDJI.

SOUTENANCE

D.E.A. d'Endocrinologie Moléculaire, Jean-Luc RICHARD, septembre 1988.