

## **Physiologie cellulaire**

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

### *Segmentation fonctionnelle du tubule rénal*

Comme on le sait, le rein est non seulement capable d'excréter une urine dont la pression osmotique, le pH et la composition chimique diffèrent de ceux du plasma sanguin, mais il est en outre susceptible de faire varier sélectivement ces différents paramètres dans l'urine en fonction des besoins de l'homéostasie du milieu intérieur. L'élaboration de l'urine définitive à partir du plasma sanguin ultrafiltré dans les glomérules rénaux s'effectue par étapes le long des différents segments tubulaires successifs qui constituent les néphrons. En effet, chaque segment tubulaire est formé par une assise unique de cellules épithéliales dont les propriétés de perméabilité et de transport sont spécifiques et dont le fonctionnement est contrôlé par des hormones définies. Ainsi, chaque segment tubulaire contribue-t-il pour une part donnée et selon des modalités qui lui sont particulières, au processus global de formation de l'urine.

Le cours, cette année, a porté sur le premier segment tubulaire du néphron, le tubule proximal. Les mécanismes moléculaires qui, dans les membranes des cellules tubulaires, sont responsables des fonctions propres à ce segment ont été discutés avec quelques détails. Le cours a ensuite été consacré à l'analyse des différences fonctionnelles qui existent entre les portions successives du tubule proximal, ainsi qu'aux modifications adaptatives qui peuvent s'y produire chez l'animal soumis à des conditions nutritionnelles bien définies, en particulier l'acidose métabolique.

\*  
\*\*

### *Segmentation morphologique du tubule proximal*

Il a été reconnu depuis quelque 25 ans que le tubule proximal pouvait être subdivisé en 3 portions successives sur la base de critères morphologiques

précis touchant l'organisation ultrastructurale des cellules épithéliales (Maunsbach, *J. Ultrastruct. Res.*, 16, 239-258, 1966) : la 1<sup>re</sup> portion, dite S<sub>1</sub>, représente environ les deux tiers de la portion contournée et comporte des cellules dont la bordure en brosse apicale est constituée de microvillosités longues et denses, tandis que la membrane basale est creusée de digitations pénétrant profondément dans le cytoplasme cellulaire. La portion S<sub>2</sub> qui lui fait suite s'étend sur le dernier tiers du tubule contourné proximal et sur la portion initiale du tubule proximal droit qui lui fait suite dans le cortex du rein ; par rapport à celles du segment S<sub>1</sub>, les cellules de la portion S<sub>2</sub> ont des bordures en brosse moins épaisses, des invaginations basales moins profondes et un chondriome moins développé. Enfin, le segment S<sub>3</sub> correspond aux parties terminales de la portion droite proximale ; il est localisé dans le cortex profond et la médullaire externe du rein. Le segment S<sub>3</sub> se distingue des deux précédents par des cellules relativement plates, comportant peu de mitochondries, des membranes basolatérales faiblement invaginées et une bordure en brosse apicale peu développée ; à cet égard, le rein de rat fait exception, qui possède un segment proximal S<sub>3</sub> dont les microvillosités apicales sont au moins aussi denses et longues que celles du segment S<sub>1</sub>.

On voit donc que les cellules qui constituent le tubule proximal du rein présentent une morphologie qui varie lorsqu'on se déplace du glomérule vers les portions distales : la réduction progressive des systèmes membranaires aux deux pôles cellulaires (et la diminution de surface qui lui correspond), ainsi que celle du système mitochondrial suggèrent des cellules dont les capacités de transport décroissent le long des portions successives du tubule proximal.

\*  
\*\*

#### *Mécanisme de la réabsorption isoosmotique proximale*

Grâce à la mise en œuvre de la méthode dite des microponctions tubulaires puis, plus récemment, de celle de microperfusion tubulaire, il a été reconnu depuis longtemps que la majeure partie (environ 60 pour 100) du fluide tubulaire filtré dans les glomérules est réabsorbée le long des portions successives du tubule proximal ; la perméabilité osmotique pour l'eau de l'assise épithéliale proximale étant très élevée, le fluide tubulaire y reste isoosmotique au plasma sanguin et la réabsorption volumique d'eau est la conséquence passive de la réabsorption sélective par les cellules proximales de différents solutés contenus dans le filtrat glomérulaire. Ainsi, l'analyse de la composition du fluide tubulaire — obtenu le long du tubule proximal par microponction in vivo — montre que la plus grande partie (80 pour 100 ou plus) du glucose et des acides aminés filtrés et au moins la moitié du bicarbonate filtré sont réabsorbés dans le premier quart du tubule proximal. Le taux de réabsorption isoosmotique dans cette première partie est au moins égal au double de celui qui est mesuré plus en aval dans S<sub>1</sub>.

On sait aujourd'hui que la réabsorption proximale des acides aminés, du glucose et des phosphates s'effectue à travers la membrane apicale des cellules par cotransport avec des ions sodium. Dans le cas des ions bicarbonates, leur réabsorption luminale est indirectement couplée à celle du sodium, via un échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (amiloride-sensible) dont l'activité acidifie le fluide tubulaire et par là y provoque la décomposition du bicarbonate et, en présence d'anhydrase carbonique, la formation de  $\text{CO}_2$  diffusible. Dans la cellule, le  $\text{CO}_2$  d'origine luminale reforme du  $\text{HCO}_3^-$  en présence d'ions  $\text{OH}^-$  ; finalement, comme on le sait depuis peu, les ions  $\text{HCO}_3^-$  intracellulaires sont transportés à travers la membrane basale des cellules proximales par un système de cotransport Na-bicarbonate (sensible au DITS) d'une stoechiométrie de 1  $\text{Na}^+$  pour 3  $\text{HCO}_3^-$ .

Il faut noter que la réabsorption préférentielle de bicarbonate (avec du sodium) le long de la portion initiale du tubule proximal a pour conséquence de produire une augmentation relative de la concentration des ions chlorures dans le fluide tubulaire ; celle-ci peut atteindre environ 20 mEq/L de plus que celle qui correspond, dans l'ultrafiltrat glomérulaire, à l'équilibre de Donnan avec le plasma. La voie intercellulaire (« shunt pathway ») étant hautement conductive aux ions dans le tubule proximal, le gradient de  $[\text{Cl}^-]$  au travers de l'assise épithéliale entraîne l'apparition d'un potentiel de diffusion (lumière électropositive) et d'un flux net de réabsorption passive, par diffusion entre les cellules, d'ions  $\text{Na}^+$  (le long de ce gradient électrique) et  $\text{Cl}^-$  (le long d'un gradient électro-chimique favorable). Cette composante intercellulaire de réabsorption passive de  $\text{NaCl}$  (accompagnée d'eau en quantité isoosmotique) augmente évidemment le long de la première partie du tubule proximal puisque c'est là que se constitue progressivement, par réabsorption sélective d'ions  $\text{HCO}_3^-$  par voie transcellulaire — comme il a été dit — le gradient de  $[\text{Cl}^-]$  nécessaire.

*In vivo* et dans les conditions normales (pour une filtration glomérulaire (SNGFR) de 30 nl/min), le taux de réabsorption isoosmotique est maximal dans la portion initiale (4 à 5 nl par minute et par mm chez le rat), puis il s'abaisse progressivement dans les portions ultérieures du tubule proximal, jusqu'à atteindre environ 2 nl/min 5 mm plus en aval, à la fin de la portion accessible à la microponction. On note donc une corrélation manifeste entre l'intensité de la *fonction* de réabsorption et les variations de *morphologie* cellulaire le long du tubule proximal. Il faut se garder toutefois d'en déduire qu'un lien de causalité unit ces deux variables et que la moindre capacité de transport observée dans les portions tubulaires proximales éloignées du glomérule serait la conséquence directe de systèmes membranaires de transports ioniques moins performants dans ces parties.

En effet, dans les conditions physiologiques qui prévalent *in vivo*, la composition qualitative et le débit du fluide tubulaire se modifient très

rapidement dans la portion initiale du tubule proximal : la concentration de l'ion bicarbonate, en particulier, atteint rapidement une valeur minimale — de l'ordre de 8mM — qui correspond à une valeur du pH luminal de l'ordre de 6,8, au-dessous de laquelle l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (ou la proton ATPase luminale) ont une vitesse de fonctionnement qui décroît rapidement. Il se pourrait dès lors que la moindre réabsorption notée in vivo dans les parties tardives du tubule proximal soit davantage la conséquence de l'acidification du fluide tubulaire intervenue en amont, plutôt que celle d'une capacité intrinsèque de transport moindre de leurs cellules. Pour trancher entre ces deux possibilités, il conviendrait de comparer les performances fonctionnelles dont sont capables les portions proximales successives lorsqu'elles sont placées dans des conditions d'environnement et de perfusion identiques (débit et composition) ; et surtout, il serait important d'analyser dans ces portions quels sont les systèmes de transports membranaires qui sont susceptibles d'agir comme facteurs limitant dans le processus de réabsorption proximale.

\*\*

#### *Hétérogénéité fonctionnelle du tubule proximal : analyse moléculaire*

Un travail récent et réalisé par microperfusion in vitro de segments tubulaires isolés (M. Baum, *Am. J. Physiol.*, 256, F335-F341, 1989) compare les capacités de transport de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apical d'une part et du cotransporteur  $1 \text{Na}^+-3\text{HCO}_3^-$  basolatéral d'autre part en les mesurant dans des conditions identiques sur des échantillons provenant de 3 portions successives du tubule proximal de lapin ( $S_1$ , début de  $S_2$  et fin de  $S_2$ ). Les expériences consistent à enregistrer les variations du pH intracellulaire (à l'aide d'une sonde fluorescente) en réponse à des changements brusques de la concentration soit du sodium, soit du bicarbonate dans la solution au contact de la membrane apicale des cellules, d'une part, ou dans celle au contact de leur membrane péritybulaire d'autre part. Les résultats montrent en substance que la vitesse initiale des réponses ( $\Delta\text{pHi}/\Delta t$ ) est sensiblement comparable dans le segment  $S_1$  et le début de  $S_2$ , alors qu'elle est beaucoup plus basse à la fin de  $S_2$  ; et ceci est vrai aussi bien pour l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apical que le cotransporteur  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$  basolatéral. Il existe donc bien une différence intrinsèque dans la capacité de transport du bicarbonate par les deux membranes des cellules tubulaires proximales, mais cette capacité n'est clairement diminuée chez le lapin que dans la portion terminale de ce segment (partie droite). Dans des expériences de microperfusion in vivo effectuées chez le rat, par contre, la capacité de transport de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apical a été trouvée deux fois plus élevée dans le premier mm du segment  $S_1$  que 3 à 5 mm en aval, cependant que le  $K_m$  apparent du système était inchangé (Lin F.Y. et Cogan M.G., *A. J. Physiol.* 247, F912-F919, 1987). L'adéquation observée le long du proximal entre capacité de transport et morphologie

cellulaire suggère que la nature des transporteurs moléculaires exprimés dans les membranes est l'objet d'un ajustement au cours de la maturation ontogénique du rein, qui l'adapte au débit et à la qualité de fluide tubulaire atteignant chaque portion successive.

#### *Adaptation de la réabsorption proximale du bicarbonate*

Dans les états d'acidose respiratoire ou métabolique chroniques, une augmentation de la réabsorption du bicarbonate par le rein a pour conséquence d'élever la concentration du bicarbonate plasmatique et par là d'augmenter quelque peu le pH sanguin (et de « compenser » partiellement l'état d'acidose). Il a été clairement montré entre 1983 et 1985 par plusieurs groupes d'auteurs que des animaux placés pendant plusieurs jours dans des conditions expérimentales d'acidose chronique voient la capacité de transport de leurs reins — et en particulier de leurs tubules proximaux — augmenter de façon importante après un temps de latence de 2 à 3 jours. Les mécanismes responsables de cette adaptation ont été analysés. Ainsi, Preisig et Alpern (*J. Clin. Invest.* 82, 1445 (1988)) ont observé, chez des rats en acidose métabolique depuis 3 jours ou plus, que la capacité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apical comme celle du cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  basal étaient toutes deux sensiblement doublées dans le segment proximal  $\text{S}_1$  par rapport à celles de ce même segment chez des rats contrôles non acidotiques. Des résultats sensiblement comparables ont été obtenus par Krapt (*J. Clin. Invest.*, 83, 890 (1989)) sur le segment  $\text{S}_2$  de lapins exposés à une acidose respiratoire pendant 2 à 3 jours.

Les mécanismes moléculaires par lesquels l'expression de ces différents systèmes de transports membranaires est sélectivement accrue en réponse aux conditions d'acidose ne sont pas connus. Il semble cependant qu'une régulation de la transcription des gènes correspondants soit impliquée, dont le déterminisme précis reste à établir.

F.M.

#### PROGRAMME DES SÉMINAIRES

5 janvier : G. LEBLANC : Etude d'un mécanisme de cotransport  $\text{Na}^+$ -sucre bactérien : aspects mécanistiques et moléculaires.

19 janvier : M. BICHARA : Rôles de la parathormone, de la vasopressine et du glucagon dans l'acidification de l'urine et dans la régulation de l'équilibre acido-basique.

26 janvier : C. LE GRIMELLEC : Relations entre fluidité membranaire et perméabilité à l'eau des cellules MDCK.

2 février : L. BANKIR : Adaptation anatomo-fonctionnelle du rein à la concentration de l'urine.

9 février : A. TRAUTMAN : Modulation des canaux ioniques par des messagers intracellulaires.

16 février : C. de ROUFFIGNAC : Effet des hormones peptidiques sur les mouvements d'ions dans les parties distales du néphron.

9 mars : G. FRIEDLANDER, P. RONCO : Expression des protéines membranaires dans des cultures primaires d'origine rénale.

16 mars : A. ZWEIBAUM : Les lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines, modèles d'études de la différenciation et des fonctions des cellules de l'épithélium intestinal.

16 mars : A. VANDEWALLE : Etablissement de lignées de cellules rénales transformées par le virus simien 40 (SV40) : modèles d'études pour la prolifération cellulaire et l'action de l'arginine vasopressine et des hormones stéroïdiennes.

23 mars : D. BUTLEN : Le facteur natriurétique atrial.

#### TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

##### I. CONTRÔLE DE LA Na-K-ATPASE TUBULAIRE PAR L'INSULINE

(E. FERAILLE, S. MARSY, L. CHEVAL, C. BARLET-BAS, A. DOUCET)

Bien que mal connu, le mécanisme de l'effet antinatriurétique de l'insuline décrit précédemment semble impliquer une stimulation de la Na-K-ATPase dans certains segments spécifiques du néphron. Pour vérifier cette hypothèse et localiser les sites d'action de l'insuline le long du néphron, nous avons recherché, chez le rat normal, un effet de l'insuline sur la Na-K-ATPase de segments médullaires et corticaux de l'anse ascendante large de Henle et du tubule collecteur isolés par microdissection. Sur des tubules incubés à 37 °C, l'insuline ( $10^{-8}$ M) inhibe de 45 % la vitesse initiale de l'influx de  $^{86}\text{Rb}$  sensible à l'ouabaine dans l'anse et le CAL, et la stimule de 60 % dans le tubule collecteur. Dans l'anse, l'inhibition est observée dès 7 min d'incubation en présence d'insuline  $10^{-8}$ M et devient maximale après 10 min. Dans le tubule collecteur, la stimulation est maximale dès 5 min et se maintient à ce niveau pendant au moins 30 min. La dose-dépendance des effets de l'insuline varie aussi en fonction des segments puisque l'anse est environ 10 fois plus sensible

à l'hormone que le tubule collecteur. Ces dissociations suggèrent que l'insuline pourrait agir sur ces deux segments par des mécanismes de transduction différents. Dans les mêmes conditions, l'insuline ne modifie dans aucun de ces segments l'activité Na-K-ATPase maximale mesurée par la quantité sensible à l'ouabaine de phosphate libéré à partir d'ATP <sup>32</sup>P. L'insuline ne modifie pas non plus les concentrations intracellulaires de Na<sup>+</sup> et de K<sup>+</sup> mesurées par microspectrophotométrie de flamme dans ces segments.

A concentration physiologique, l'insuline exerce donc des effets directs et de sens contraires dans l'anse de Henle et le canal collecteur. L'effet de l'insuline sur la Na-K-ATPase est indépendant de modifications du V<sub>max</sub> de l'enzyme et de la concentration intracellulaire du sodium, suggérant qu'elle pourrait modifier l'affinité de la Na-K-ATPase pour le sodium, comme cela a été observé dans d'autres tissus.

## II. CONTRÔLE DE LA POMPE À 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. D'autre part, ils ont montré que l'activité de l'ATPase NEM-sensible est contrôlée dans des segments spécifiques du néphron par des hormones (aldostérone) et au cours d'altérations métaboliques telles que l'acidose ou l'alcolose métaboliques. Les études entreprises cette année ont visé à étudier d'autres paramètres physiologiques qui contrôlent l'activité de cette pompe. Nous avons ainsi recherché les effets des prostaglandines d'une part, et de la déplétion potassique d'autre part.

Des travaux de microperfusion tubulaire *in vitro* ont montré que l'addition de prostaglandine inhibe l'acidification du fluide tubulaire au niveau du tubule collecteur médullaire du lapin (Hays et al. *J. Clin. Invest.* 78 1279-1286, 1986). Nous avons donc recherché si cet effet pouvait résulter d'une inhibition par les prostaglandines (PG) de la H-ATPase NEM-sensible du tubule collecteur. Des expériences *in vivo* ont montré, chez des rats surrénalectomisés, que l'injection chronique (2 jours) d'un inhibiteur de la synthèse des PG tel que l'indométhacine induit une stimulation importante de l'activité ATPase NEM-sensible dans les régions corticales et médullaires du tubule collecteur. Par ailleurs, l'addition de PGE<sub>2</sub> ou de PGF<sub>2a</sub> (0.2 μM) lors du dosage de l'ATPase NEM sensible provoque une inhibition importante de l'activité de cette enzyme dans le tubule collecteur du rat. Ces résultats suggèrent que les PG contrôlent négativement l'ATPase NEM sensible du tubule collecteur de rat et que cet effet pourrait être responsable de l'action de ces hormones sur l'acidification urinaire dans le tubule collecteur.

Dans une autre étude, nous avons recherché les variations de l'activité ATPasique NEM-sensible au cours d'une déplétion potassique. En effet, des rats nourris avec un régime pauvre en potassium développent une alcalose métabolique chronique en dépit d'une hypoaldostéronémie marquée. De plus, dans le tubule collecteur de ces animaux, on observe une stimulation marquée de l'activité K-ATPasique associée à une augmentation de la réabsorption de  $K^+$  et de la sécrétion de protons (cf. III). Nos résultats montrent que chez les rats déplétés en potassium, l'activité ATPasique NEM-sensible est diminuée dans les parties corticales et médullaires du tubule collecteur. Cette diminution peut être le résultat de l'alcalose métabolique et/ou de l'hypoaldostéronémie puisque nous avons précédemment montré que ces deux paramètres contrôlent la H-ATPase du tubule collecteur. La fonction physiologique de cette inhibition n'est pas connue. Cependant elle pourrait permettre de compenser l'hypersécrétion de protons consécutive à la stimulation de la K-ATPase, cette dernière permettant, elle, la conservation de ions  $K^+$  au cours de la déplétion potassique.

### III. CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE LA K-ATPase RÉNALE

(L. CHEVAL, C. BARLET-BAS, A. DOUCET, en collaboration avec G. PLANELLES et T. ANAGNOSTOPOULOS, I.N.S.E.R.M. U323, Hôpital Necker)

Des résultats des années précédentes avaient démontré l'existence, au niveau des segments distaux du néphron de lapin et de rat, d'une activité ATPasique spécifiquement stimulée par les ions potassium (en absence de sodium) et inhibée par le vanadate et l'oméprazole, un inhibiteur de la pompe H/K gastrique. Les études entreprises cette année et concernant cette enzyme ont visé à démontrer la similarité entre cette K-ATPase rénale et la H/K-ATPase gastrique, et plus particulièrement à prouver l'implication au niveau du tubule distal de la K-ATPase dans la réabsorption de potassium et la sécrétion de protons.

Nos résultats montrent que dans le tubule collecteur de rat, l'activité K-ATPasique est totalement et spécifiquement inhibée par un dérivé imidazopyridinique, le SCH 28080, un autre inhibiteur de la pompe gastrique. L'utilisation de cet inhibiteur nous a permis de mettre en évidence, sur des tubules collecteurs corticaux et médullaires de rats, un influx de  $^{86}\text{Rb}$  inhibé par le SCH 28080, démontrant que l'activité K-ATPasique est associée à une accumulation de K/Rb dans les cellules. De plus, la fraction de l'influx de  $^{86}\text{Rb}$  qui est sensible au SCH 28080 est augmentée dans les tubules collecteurs issus de rats déplétés en potassium depuis 3 ou 7 jours, tout comme est stimulée l'activité K-ATPasique. Ceci démontre que l'influx de  $^{86}\text{Rb}$  sensible au SCH 28080 correspond à une réabsorption de potassium.

En collaboration avec l'U323 de l'Hôpital Necker, nous avons de plus caractérisé une activité K-ATPase dans le néphron distal des amphibiens (grenouille et necturus). Cette ATPase présente les mêmes caractéristiques cinétiques et pharmacologiques que son homologue chez les mammifères. Enfin, l'administration de SCH 28080 à des Necturus induit une alcalinisation du liquide intratubulaire dans le tubule distal terminal (où est localisée la K-ATPase), ce qui démontre que la K-ATPase participe à l'acidification urinaire.

Ces résultats confirment donc l'homologie pharmacologique et fonctionnelle entre la K-ATPase rénale et la pompe H/K gastrique, et démontrent que l'enzyme rénale participe à la sécrétion de proton et à la réabsorption de potassium dans les segments terminaux du néphron.

#### IV. ONTOGÉNÈSE POST-NATALE DU SYSTÈME GUANYL CYCLASIQUE SENSIBLE AU PEPTIDE NATRIURETIQUE ATRIAL DU REIN DE RAT

(D. BUTLEN, D. CHABARDES, B. SEMMEKROT, S. ROSEAU et S. SIAUME-PEREZ)

Nous avons décrit précédemment que les récepteurs du Peptide Natriurétique Atrial (ANP) présents dans les glomérules et canaux collecteurs de la médulla interne, sont très peu nombreux à la naissance et que leur densité augmente progressivement durant la période de lactation dans ces deux structures, pour atteindre le niveau adulte lors du sevrage de l'animal.

Ce travail a été continué en mesurant la production de GMP cyclique à partir de GTP endogène par une guanyl cyclase membranaire stimulable par l'ANP dans des glomérules microdisséqués à partir de reins de jeunes rats. L'évolution post-natale de cette réponse à l'ANP a été comparée à celles de guanyl cyclases cytosoliques activables par la carbamylcholine ou par le nitroprusside de sodium.

Chez le jeune animal comme chez l'adulte : 1) la production de GMP cyclique induite par l'ANP est proportionnelle au nombre de glomérules ; 2) elle augmente et est saturable en fonction de la concentration d'ANP ; et 3) des doses maximales d' $\alpha$ -rANP 1-28 et d'atriopeptine III engendrent des accumulations de nucléotide similaires.

Par contre, de grandes différences apparaissent dans l'évolution des réponses déclenchées par chacun des trois agonistes testés. La plus forte production de GMP cyclique stimulée par l'ANP a été observée chez le rat nouveau né ; elle diminue au cours de la période de lactation pour ne plus représenter que 1.6 fois celle de l'adulte chez le rat de 34 jours. Par opposition, la réponse à la carbamylcholine est très faible à la naissance,

augmente avec l'âge et atteint le niveau adulte lors du sevrage de l'animal, alors que celle au nitroprusside reste constante durant toute la période étudiée.

On assiste donc pendant les trois premières semaines de vie néonatale à un effondrement de l'efficacité de la fonction de couplage du système guanyl cyclasique ANP-dépendant. Ce phénomène suggère que l'absence de réponse polyurique et natriurétique du très jeune rat à l'administration d'ANP exogène pourrait être la conséquence, soit d'un défaut dans les équipements enzymatiques stimulables par le GMP cyclique, systèmes qui se mettraient en place progressivement lors de l'ontogénèse post-natale, soit de l'absence de gradient osmotique intrarénal qui masquerait les effets de l'ANP.

#### V. CARACTÉRISATION DES RÉCEPTEURS DE LA VASOPRESSINE LE LONG DU NEPHRON DE RAT

(D. BUTLEN, A. AMMAR, S. ROSEAU, en collaboration avec A. SCHMIDT, centre C.N.R.S.-I.N.S.E.R.M. de Pharmacologie-Endocrinologie, Montpellier).

La synthèse et la [<sup>125</sup>I] radio-iodination d'un nouvel antagoniste des effets antidiurétiques et vasopresseurs de la vasopressine : la d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> [Tyr(Me)<sup>2</sup>, Thr<sup>4</sup>, Tyr-NH<sub>2</sub><sup>9</sup>]OVT, ont permis d'étudier la distribution des récepteurs de la vasopressine le long du néphron, en mesurant la liaison spécifique du radioligand sur des fragments tubulaires microdisséqués à partir de reins de rat prétraités à la collagénase.

Dans les canaux collecteurs de la médulla externe : 1) la liaison spécifique de [<sup>125</sup>I] d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> [Tyr(Me)<sup>2</sup>, Tyr<sup>4</sup>, Tyr-NH<sub>2</sub><sup>9</sup>]OVT est saturable en fonction du temps et de la dose, et est réversible après élimination du ligand (les constantes de vitesses d'association et de dissociation mesurées à 4°C sont égales à  $9 \times 10^6 \text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  et  $2 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$  respectivement) ; 2) la liaison est inhibée de façon dose-dépendante par l'analogue correspondant non marqué ; et 3) les sites possèdent les affinités apparentes suivantes pour une série d'analogues de la vasopressine : dDAVP > AVP > AVT = d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> [Tyr(Me)<sup>2</sup>, Thr<sup>4</sup>, Tyr-NH<sub>2</sub><sup>9</sup>]OVT > OT >> [Thr<sup>4</sup>, Gly<sup>7</sup>]OT = [Phe<sup>2</sup>, Orn<sup>8</sup>]VT = d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> [Tyr(Me)<sup>2</sup>]AVP. Les sites caractérisés dans ce segment présentent donc les propriétés pharmacologiques des récepteurs V<sub>2</sub> de la vasopressine, qui sont impliqués dans l'activation d'une adényl cyclase, par opposition aux récepteurs V<sub>1</sub> couplés à la stimulation de la phospholipase C.

D'autre part, les sites de haute affinité ne sont identifiables que dans les segments possédant une activité adényl cyclasique sensible à la vasopressine : les parties médullaire (MAL) et corticale (CAL) de la branche large ascendante et les parties corticale (CCT) et médullaire (MCT) du canal collecteur.

Aucune liaison spécifique n'est observable dans le glomérule et le tubule proximal qui sont dépourvus de systèmes adényl cyclasiques vasopressine-dépendants.

Finalement, les concentrations seuil de radioligand qui sont nécessaires pour détecter la présence de sites spécifiques sont plus faibles pour les CCT et MCT que pour les MAL et CAL. Par ailleurs, on avait démontré antérieurement que l'affinité apparente pour la vasopressine de l'adényl cyclase du collecteur est environ 10 fois meilleure que celle de la branche large ascendante.

Ces observations suggèrent qu'il existerait deux sous-classes de récepteurs  $V_2$  dans le néphron de rat, les uns à forte affinité pour l'hormone seraient situés dans le canal collecteur et contrôlèrent la perméabilisation à l'eau de ce segment induite par de faibles taux de vasopressine circulante, et les autres de plus faible affinité, seraient localisés dans le segment de dilution et réguleraient les processus de réabsorption de  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  et de  $Mg^{2+}$  sous l'effet de plus fortes concentrations d'hormones circulantes.

#### *VI. INHIBITION DE L'ACCUMULATION d'AMP CYCLIQUE INDUITE PAR L'HORMONE ANTIDIURETIQUE DANS LE CANAL COLLECTEUR MÉDULLAIRE DE REIN DE RAT : ÉTUDES SUR LE MÉCANISME D'ACTION DE LA $PGE_2$ .*

(D. CHABARDES, M. MONTEGUT, S. SIAUME-PEREZ, L. AARAB)

L'accumulation d'AMP cyclique induite par l'hormone antidiurétique (AVP) dans la partie médullaire du canal collecteur de rat (MCT) est inhibée par plusieurs facteurs dont la prostaglandine  $E_2$  ( $PGE_2$ ). Nos résultats antérieurs nous ont permis d'établir quelques caractéristiques de cette régulation : 1) contrairement à l'action d'un agoniste  $\alpha_2$  adrénergique tel que la clonidine, la  $PGE_2$  n'a pas d'effet inhibiteur en présence d'un blocage total des activités phosphodiésterasiques ; 2) la présence d'un antagoniste des récepteurs  $A_1$  de l'adénosine n'affecte pas l'inhibition induite par le  $PGE_2$  ; et 3) l'effet inhibiteur de la  $PGE_2$  est cumulatif avec celui induit par la clonidine ou par un agoniste  $A_1$  de l'adénosine.

Ces résultats montrent que l'action de la  $PGE_2$  n'est pas due à une diminution de l'activité adényl-cyclasique et donc qu'un autre mécanisme doit rendre compte de l'inhibition induite par la  $PGE_2$  vis-à-vis de l'accumulation d'AMP cyclique dans le MCT.

De nouvelles expériences ont eu pour but de mieux cerner le processus de transduction membranaire par lequel la  $PGE_2$  exerce son effet, et le ou les mécanismes intracellulaires responsables de la diminution du taux intracellulaire d'AMP cyclique.

Les résultats obtenus démontrent plusieurs points :

— L'action de la  $PGE_2$  est totalement dépendante de la présence de calcium dans le milieu d'incubation. Il y a donc un rôle déterminant joué par le calcium extracellulaire, observation qui nous a amenés à tester l'effet des ionophores à calcium. Les ionophores tels que l'ionomycine ou le A23187 utilisés à faible concentration ( $10^{-8}M$  ou  $10^{-7}M$ ) reproduisent l'effet inhibiteur de la  $PGE_2$  sur l'accumulation d'AMP cyclique induite par l'AVP.

Des propriétés d'inhibition identiques à celles de la  $PGE_2$  sont observées pour les ionophores à calcium : effet localisé dans la partie médullaire mais non corticale du canal collecteur, effet bloqué par l'inhibition totale des activités phosphodiésterasiques ou par l'absence de calcium dans le milieu d'incubation.

De plus, aucun effet inhibiteur cumulatif n'est observé lorsque la  $PGE_2$  et un ionophore à calcium sont ajoutés simultanément au milieu d'incubation.

Ces résultats suggèrent que la  $PGE_2$  et les ionophores à calcium empruntent un même mécanisme pour inhiber l'accumulation d'AMP cyclique, mécanisme qui pourrait être médié par une entrée de calcium dans la cellule.

Le récepteur à la  $PGE_2$  est-il lié directement à un canal calcium comme cela est décrit dans certains tissus ? L'addition de nifépidine, de vérapamil ou de lanthane n'affecte pas l'effet inhibiteur de la  $PGE_2$ .

L'implication éventuelle d'une protéine G sensible à la toxine de Bordetella Pertussis a également été recherchée. Après 3 heures de pré-incubation en présence de cette toxine, l'inhibition par la  $PGE_2$  est toujours présente alors que les effets inhibiteurs de la clonidine et d'un agoniste  $A_1$  de l'adénosine ne sont plus observés.

Enfin, l'addition d'antagonistes de la calmoduline (W7, calmidazolium ou trifluoperazine) diminue d'environ 50 % l'accumulation d'AMP cyclique induite par l'AVP mais ne modifie pas le taux d'inhibition observé avec la  $PGE_2$ . Un enzyme dépendant d'un complexe actif calcium-calmoduline, tel que certaines catégories de phosphodiésterase, ne semble donc pas impliqué dans le mécanisme d'action de la  $PGE_2$ .

## VII. PRÉSENCE DE RÉCEPTEURS CHOLINERGIQUES DANS LE TUBULE COLLECTEUR DU REIN DE RAT

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

Nous avons indiqué dans notre précédent rapport d'activité que l'utilisation de Fura-2 comme indicateur fluorescent de la concentration du calcium ionisé et de ses variations dans le compartiment intracellulaire pouvait permettre

d'étudier les modalités de renouvellement et de régulation du calcium dans des segments tubulaires uniques superfusés *in vitro*. Après avoir mis en évidence, dans les membranes cellulaires du tubule collecteur de rein du rat, la présence de canaux calciques voltage indépendants ainsi que celle d'un échangeur Na/Calcium, nous avons recherché quelles hormones pouvaient faire varier  $[Ca]_i$  dans les cellules de ce segment tubulaire. Des augmentations reproductibles de  $[Ca]_i$  ont été obtenues avec les agonistes cholinergiques : les réponses sont habituellement biphasiques et comportent un pic initial de calcium d'origine intracellulaire (probablement libéré en réponse à la production d' $IP_3$ ) suivi d'une augmentation maintenue en plateau, et qui correspond à l'entrée du calcium extracellulaire (ce plateau disparaît en l'absence de calcium externe). L'étude pharmacologique de ces réponses montre : a) que les récepteurs cholinergiques impliqués sont de type muscarinique ( $M_1$  ou  $M_3$ ) et présentent une sensibilité vis-à-vis de l'acétylcholine comparable à celle notée dans d'autres tissus-cible ; b) la phase en plateau de la réponse calcique met en jeu des canaux non-voltage dépendants et insensibles aux inhibiteurs habituels des canaux calciques. La technique utilisée ne permet pas d'établir sur quelle face des cellules épithéliales tubulaires se trouvent localisés ces canaux. La nature de la réponse physiologique induite par les agonistes cholinergiques sur le canal collecteur reste également à découvrir en faisant appel à d'autres méthodes expérimentales.

#### VIII. ANALYSE DE LA COMPOSITION DU MILIEU INTRACELLULAIRE SUR SEGMENT DE NÉPHRON MICROPERFUSE IN VITRO

(M. IMBERT-TEBOUL)

Comme nous l'avons exposé ci-dessus, la mesure des concentrations intracellulaires de calcium et de protons, telles qu'elles sont actuellement pratiquées au laboratoire sur des segments tubulaires isolés et superfusés, apporte des informations précieuses tant sur la nature des canaux et transporteurs membranaires présents dans ces segments que sur celle des hormones qui les régulent. Elle ne permet malheureusement pas de déterminer s'ils sont localisés sur la face apicale ou la face basolatérale des cellules, ce qui limite considérablement l'interprétation des résultats, notamment pour ce qui concerne les mécanismes de transduction de l'effet hormonal et le rôle physiologique des systèmes de transport ainsi identifiés. C'est pour combler cette lacune que nous avons décidé de développer au laboratoire la technique de microperfusion *in vitro* de tubule isolé et de l'associer à une analyse quantitative de la composition du milieu intracellulaire, faite à l'aide de sondes fluorescentes. La microperfusion est, en effet, la seule approche qui permette actuellement, sur le matériel que nous étudions, de contrôler de manière indépendante la composition du milieu qui baigne les faces apicale et basolatérale des cellules.

Elle permet, en outre, de mesurer des flux nets transépithéliaux d'électrolytes et ainsi d'identifier la nature de l'effet physiologique final exercé par les hormones sur les différents segments du néphron.

Pour atteindre cet objectif l'un des chercheurs de notre équipe (M. Imbert-Teboul) est allée apprendre la technique de microperfusion tubulaire dans les laboratoires du Pr C. Amiel (Faculté Xavier Bichat) et du Dr C. de Rouffignac (CEN Saclay) où elle se pratique en routine. Nous avons, dans le même temps (88 et 89), acquis et monté l'installation de microperfusion. Pour mesurer la fluorescence, nous avons choisi le dispositif (MSP21) Zeiss.

L'ensemble est actuellement fonctionnel. Les données recueillies (1 couple de mesures toutes les 2 secondes) peuvent être stockées en continu sur le disque dur d'un ordinateur et visualisées sur écran grâce au programme mis au point par G. Vassent.

Les premières études ont porté sur la localisation des canaux calciques mis en évidence dans le canal collecteur de rat par J. Marchetti et S. Taniguchi. Les résultats d'ores et déjà acquis montrent la présence de ces canaux calciques sur la face basolatérale, mais pas sur la face apicale des cellules du canal collecteur médullaire. Des données préliminaires montrent aussi que la vasopressine provoque, à partir du milieu périlitubulaire, une entrée intracellulaire de calcium. Nous nous proposons de caractériser la nature du récepteur impliqué dans cet effet de l'hormone, ainsi que celle des canaux membranaires ouverts par la vasopressine.

D'une manière générale, les études faites sur tubules microperfusés sont menées de telle sorte qu'elles puissent répondre aux questions posées par les expériences, plus globales, faites sur les tubules superfusés, tant pour le calcium que pour le pH. L'apparition récente sur le marché d'une sonde fluorescente permettant de mesurer le sodium intracellulaire (SBFI) ouvre également un large champ d'investigation, en relation avec l'action des hormones stéroïdes sur la réabsorption rénale du sodium.

#### BIBLIOGRAPHIE

S. TANIGUCHI, J. MARCHETTI & F. MOREL. *Cytosolic free calcium in single microdissected rat cortical collecting tubules* (Pflügers Arch., 414 : 125-133, 1989).

S. TANIGUCHI, J. MARCHETTI & F. MOREL. *Na/Ca exchangers in collecting cells of rat kidney. A single tubule fura-2 study* (Pflügers Arch., 415 : 191-197, 1989).

O. LEVILLAIN, A. HUS-CITHAREL, F. MOREL & L. BANKIR. *Production of urea from arginine in Pars Recta and collecting duct of the rat kidney* (Renal Physiol. Biochem., 12 : 302-312, 1989).

A. DOUCET & C. BARLET-BAS. *Involvement of Na-K-ATPase in the antinatriuretic action of mineralocorticoids in the mammalian kidney. Current Topics in Membranes and Transports*, édité par S.G. SCHULTZ, Academic Press, San Diego, pp. 185-208, 1989.

C. KHADOURI, S. MARSY, C. BARLET-BAS & A. DOUCET. *Short-term effect of aldosterone on NEM-sensitive ATPase in rat collecting tubule* (Am. J. Physiol. 257 : F177-F181, 1989).

D. BUTLEN, B. SEMMEKROT & S. ROSEAU. *Post natal ontogenesis of atrial natriuretic peptide (ANP) receptors in glomeruli and inner medullary collecting tubules in rat kidney. 4th Intern. Workshop on Developmental Renal Physiology*. Montréal, 24-26 Août, 1989 (Abstract).

B. SEMMEKROT, P.H. WIESEL, L. MONNENS & J.P. GUIGNARD. *Age differences in renal responsiveness to alpha-human-atrial natriuretic peptide (a-hANP) in the rabbit. 4th International Workshop on developmental Renal Physiology*. Montréal, 24-26 Août 1989 (Abstract).

A. DOUCET, C. BARLET-BAS, S. SIAUME-PEREZ, C. KHADOURI, L. CHEVAL, G. EL MERNISSI & S. MARSY. *Corticosteroids control vasopressin-sensitive adenylate cyclase (AC) in the rat distal nephron*. Europ. Soc. of Renal Biochem. 9th Symp. on Biochemistry. Aspects of Kidney Functions. Salamanca, Espagne, June 28-30, 1989 (Abstract).

D. CHABARDES, M. MONTEGUT & S. SIAUME-PEREZ. *PGE<sub>2</sub> and Ca<sup>++</sup> ionophores inhibit vasopressin (AVP)-stimulated cAMP level by a same mechanism in the rat medullary collecting tubule (MCT)*. Europ. Soc. of Renal Biochem. 9th Symp. on Biochemistry. Aspects of Kidney Functions. Salamanca, June 28-30, 1989 (Abstract).

O. LEVILLAIN, A. HUS-CITHAREL, F. MOREL & L. BANKIR. *Production of urea from arginine in Pars Recta and collecting duct of the rat kidney*. Europ. Soc. of Renal Biochem. 9th Symp. on Biochemistry. Aspects of Kidney Functions. Salamanca, June 28-30, 1989 (Abstract).

C. BARLET-BAS, C. KHADOURI, S. MARSY & A. DOUCET. *In vitro control of Na-K-ATPase by intracellular sodium in collecting tubule*. Third Forefront Symposium of the International Society of Nephrology. Arolla, Suisse, 2-6 juillet 1989 (Abstract).

A. DOUCET & C. BARLET-BAS. *Involvement of Na-K-ATPase in the antinatriuretic action of aldosterone in the mammalian kidney*. Proc. Int. Union Physiol. Sci., Helsinki, Finland, 9-14 juillet 1989, pp 134-135 (Abstract).

D. CHABARDES, M. MONTEGUT & S. SIAUME-PEREZ. *Similitude des actions inhibitrices de la PGE<sub>2</sub> et des ionophores à Ca<sup>++</sup> vis-à-vis de l'accumulation d'AMP cyclique induite par la vasopressine (AVP) dans le canal collecteur médullaire (MCT)*. *Associat. des Physiologistes, 57e Réunion*. Marseille, 20-24 sept. 1989 (Abstract).

D. BUTLEN, B. SEMMEKROT & S. ROSEAU. *Ontogenèse post-natale des récepteurs du peptide natriurétique atrial dans les glomérules et canaux collecteurs de la medulla interne de rein de rat*. *Associat. des Physiologistes, 57e Réunion*. Marseille, 20-24 sept. 1989 (Abstract).

J. MARCHETTI, S. TANIGUCHI, F. LEBRUN & F. MOREL. *Cholinergic modulation of intracellular calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) via muscarinic receptors in rat medullary collecting duct (MCD)*. XIVth Europ. Symp. on Hormone and Cell Regulation. Mont Sainte-Odile, 25-28 Sept. 1989.

F. MOREL. *Sites et mécanismes d'action des hormones dans le rein*. *Proceedings, Ecole Internationale sur l'Endocrinologie et l'Adaptation à l'Environnement*, Rabat, 7-10 mai 1990, Faculté des Sciences de Rabat, éd., p. 47-55, 1990.

E. FERAILLE, S. MARSY, L. CHEVAL, R. RAJERISON, C. BARLET-BAS, C. KHADOURI & A. DOUCET. *Effets opposés de l'insuline sur la Na-K-ATPase le long du néphron de rat*. *Assoc. de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques*. Alfédián, El Kantaoui, 18-21 mars 1990 (Abstract).

E. FERAILLE, S. MARSY, L. CHEVAL, C. BARLET-BAS, C. KHADOURI & A. DOUCET. *Dualité des effets de l'insuline sur la Na-K-ATPase le long du néphron*. *Journées de l'hypertension artérielle*, Paris, Arch. Maladies Cœur Vaisseaux, Décembre 1989 (Abstract).

F. MOREL, J. MARCHETTI, F. LEBRUN & S. TANIGUCHI. *Calcium calibration in single Fura-2 loaded kidney tubules studied by epifluorescence microscopy*. *Fluorescence Session at the Warwick SEB Meeting*, March 19-23, 1990 (Abstract : [A 18-11]).

J. MARCHETTI, F. LEBRUN, S. TANIGUCHI & F. MOREL. *Effects of cholinergic agonists on cell calcium in single Fura-2 loaded nephron portions*. *Fluorescence Session at the Warwick SEB Meeting*, March 19-23, 1990 (Abstract : [A 18-15]).

B. SEMMEKROT, D. CHABARDES, S. ROSEAU, S. SIAUME-PEREZ, L. MONNENS & D. BUTLEN. *Ontogeny of cyclic GMPO production by atrial natriuretic peptide in glomeruli microdissected from kidney of young rats*. 39th Scientific Meeting of the Dutch Mephrologic Society, June 16th 1990, Maastricht, The Netherlands (Abstract).

B. SEMMEKROT, S. ROSEAU, G. VASSENT & D. BUTLEN. *Developmental patterns of renal atrial natriuretic peptide receptors : [125I]alpha-rat atrial natriuretic peptide binding in glomeruli and inner medullary collecting tubules microdissected from kidneys of young rats.* Mol. and Cell. Endocr. 68 : 35-43, 1990.

A. DOUCET, C. BARLET-BAS, S. SIAUME-PEREZ, C. KHADOURI & S. MARSY. *Glucocorticoids control adenylate cyclase in specific nephron segments.* Am. J. Physiol. 258 : F812-F820, 1990.

C. BARLET-BAS, C. KHADOURI, S. MARSY & A. DOUCET. *Enhanced intracellular sodium concentration in kidney cells recruits a latent pool of Na-K-ATPase whose size is modulated by corticosteroids.* J. Biol. Chem. 265 : 7799-8003, 1990.

A. DOUCET, C. BARLET-BAS, C. KHADOURI, L. CHEVAL, S. SIAUME-PEREZ & S. MARSY. *Control of hormone-sensitive adenylate cyclase by corticosteroids in the rat distal nephron.* XIth Intern. Congr. of Nephrology, Tokyo, July 15-20, 1990 (Abstract).

C. BARLET-BAS, L. CHEVAL, C. KHADOURI, S. MARSY & A. DOUCET. *Difference in the Na affinity of Na-K-ATPase along the rabbit nephron : modulation by K.* XIth Intern. Congr. of Nephrology, Tokyo, July 15-20, 1990 (Abstract).

L. CHEVAL & A. DOUCET. *Na-K-ATPase mediated rubidium influx in single segments of rat nephron.* XIth Intern. Congr. of Nephrology, Tokyo, July 15-20, 1990 (Abstract).

E. FERAILLE, S. MARSY, L. CHEVAL, C. BARLET-BAS, C. KHADOURI & A. DOUCET. *Dual effects of insulin on Na-K-ATPase along the rat nephron.* XIth Intern. Congr. of Nephrology, Tokyo, July 15-20, 1990 (Abstract).

#### EXPOSÉS, MISSIONS, CONGRÈS ET STAGES

M<sup>me</sup> D. CHABARDÈS, M. A. DOUCET, et M. F. MOREL ont participé au « IXth International Symposium on Biochemical Aspects of Kidney Function », Salamanca, Espagne, 27-30 juin 1989.

M. F. MOREL et M. A. DOUCET ont participé au XXI<sup>e</sup> Congrès International des Sciences Physiologiques (I.U.P.S.) Helsinki, Finland, juillet, 1989. M. F. MOREL y a présidé un symposium et fait un exposé ; M. A. DOUCET y a fait un exposé sur invitation et présenté une communication libre.

A. DOUCET a été invité à présenter un exposé à la Conférence Jacques Monod « Molecular Mechanisms of Signal Transduction », Roscoff, juillet 1989.

M<sup>me</sup> C. BARLET-BAS a fait une communication au « Third Forefront of the International Society of Nephrology », Arolla, Suisse, juillet 1989.

Mrs D. BUTLEN et B. SEMMEKROT ont présenté chacun une communication au 4th International « Workshop on Developmental Renal Physiology », Montréal.

M. B. SEMMEKROT a présenté des communications au 15th International Congress on Pediatric Nephrology à Toronto et au 39th scientific meeting of the Dutch Nephrologic Society, Maastricht.

M. D. BUTLEN a présidé une séance de la 57<sup>e</sup> réunion de l'Association des Physiologistes, Marseille, 1989 ; M<sup>me</sup> D. CHABARDÈS, et M. P. MENETON y ont également présenté des communications.

M. F. MOREL et M<sup>me</sup> J. MARCHETTI ont participé au XIV European Symposium on « hormones and cell regulation ». Mont Sainte-Odile, 25-28 septembre 1989.

M. F. MOREL a donné une conférence sur invitation au 9<sup>e</sup> congrès de la Société d'Endocrinologie, Strasbourg, octobre 1989.

M. A. DOUCET a effectué une mission de recherche à la faculté des Sciences de Marrakech, Maroc, novembre 1989.

M<sup>me</sup> J. MARCHETTI a participé au colloque organisé par la section 27 du Comité National du C.N.R.S., Lyon, 8 novembre 1989.

M. F. MOREL a effectué une mission à Buenos-Aires en novembre 1989, comme professeur invité, à la Faculté de médecine. Il y a fait deux exposés. En outre, M. F. MOREL a donné une conférence sur invitation à la réunion de la Société Argentine d'Investigation Clinique à Mar de Plata.

M. A. DOUCET a participé à des conférences sur invitations à l'hôpital Cantonal Universitaire, Genève, Suisse, février 1990, au Centre Hospitalier Régional Universitaire d'Angers, mars 1990, et au Max-Planck-Institut für Systemphysiologie, Dortmund, RFA, avril 1990.

M. F. MOREL a fait un exposé à Sophia-Antipolis à Nice, février 1990.

M. F. MOREL a fait un exposé sur invitation à la Society for Experimental Biology (Fluorescence session) at the Warwick SEB Meeting, Warwick, mars 1990 ; y participait également M<sup>me</sup> J. MARCHETTI.

Dans le cadre de l'Ecole d'Eté « l'Endocrinologie et l'Adaptation à l'Environnement », M. F. MOREL a fait un exposé à la faculté de Rabat, Maroc, mai 1990.

M. R.M. RAJERISON a effectué une mission de perfectionnement (en vue d'utiliser la technique de H.P.L.C. pour mesurer les inositol phosphates produits lors de la stimulation de glomérules par la carbamylcholine) au centre C.N.R.S.-I.N.S.E.R.M. de Pharmacologie-Endocrinologie de Montpellier, sous la direction de Gilles GUILLON, mai 1990.

#### ENSEIGNEMENT

Mrs D. BUTLEN, A. DOUCET, F. MOREL et R. RAJERISON ont participé chacun, pour 5 à 8 heures, au D.E.A. de Physiologie et Physiopathologie Rénales, Paris VII.

En outre, M. A. DOUCET a donné des leçons au D.E.A. de Pharmacologie de Paris VI, à la Maîtrise de Biologie Cellulaire de Paris VII, à la préparation au CAPES interne des Sciences Naturelles, à la préparation à l'Agrégation de Sciences Naturelles ; D. BUTLEN a donné des leçons à la préparation à l'Agrégation de Sciences Naturelles, et au D.E.A. d'Endocrinologie de Paris VI ; M<sup>me</sup> C. BARLET-BAS a enseigné au Magistère de Biologie ; et M<sup>me</sup> D. CHARBARDÈS à la Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales (faculté de Médecine).

#### DISTINCTIONS

M. F. MOREL a reçu la Wolhard-Medaille de la deutsche Gesellschaft für Nephrologie, Bern, 18-20 septembre 1989.

GROUPE DE NEUROENDOCRINOLOGIE CELLULAIRE  
ET MOLÉCULAIRE - U.R.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 1989 - Juin 1990

L'objectif général des recherches réside dans une analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans les régulations neuroendocrines, envisagées aux deux niveaux du complexe hypothalamo-hypophysaire. Des approches multidisciplinaires sont appliquées à des modèles de cellules en culture, préalablement caractérisés : cultures primaires et lignées continues de cellules antéhypophysaires de rat d'une part, de neurones hypothalamiques de souris et de rat d'autre part.

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

Les travaux publiés concernent plusieurs aspects des mécanismes de régulation de la sécrétion de prolactine étudiés à plusieurs niveaux du processus sécrétoire.

*Mécanismes intracellulaires de l'effet transcriptionnel de la thyrolibérine sur le gène de la prolactine*

(J.N. LAVERRIÈRE, D. GOURDJI)

Le neuropeptide thyrolibérine (TRH) exerce un double effet sur la sécrétion de prolactine. Il stimule, d'une part, la libération de prolactine préformée et d'autre part, la néosynthèse de prolactine. Ces deux effets sont indépendants. En utilisant un modèle homogène de cellules à prolactine de rat, la lignée GH3/B6, J.N. LAVERRIÈRE s'est attaché depuis plusieurs années à analyser les mécanismes de l'action stimulante du TRH sur l'expression du gène de la prolactine. Il a ainsi montré successivement que : 1. le TRH exerce un effet transcriptionnel rapide et transitoire sur la transcription du gène de la prolactine et, en même temps, stabilise les ARNm PRL, 2. l'effet transcriptionnel du TRH est directement corrélé à l'occupation persistante d'un nombre limité de sites récepteurs, 3. l'effet transcriptionnel du TRH met en jeu les seconds messagers générés par l'hydrolyse des polyphosphoinositols en réponse à l'occupation des sites récepteurs TRH, soit l'inositol 1-4-5 triphosphate (IP3)

et le diacylglycérol (DAG). On sait que l'IP3 est responsable de l'augmentation précoce et transitoire de la concentration du calcium cytosolique ( $\text{Ca}^{2+}$ ), à partir d'un compartiment de stockage localisé dans le reticulum endoplasmique et que le DAG active la protéine kinase C. L'emploi de drogues capables respectivement d'augmenter la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  (ionophores) ou d'activer la protéine kinase C (esters de phorbol, TPA) avait précédemment permis à J.N. LAVERRIÈRE de montrer que ces agents sont capables, chacun séparément, d'activer la transcription du gène de la prolactine, mais avec une efficacité moindre que le TRH et de manière non additive à ce dernier ; par contre, leur combinaison reproduit l'effet transcriptionnel du TRH. Le travail publié cette année a eu pour objectif d'analyser l'effet transcriptionnel de l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique issue d'un autre mécanisme, lui aussi activé par le TRH, mais de manière un peu plus tardive. Il s'agit des canaux calcium dépendant du voltage, dont l'activation permet l'influx du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. L'emploi des dihydropyridines (DHP) spécifiques d'une classe de canaux calcium (L) dépendant du voltage a permis d'analyser de manière précise le rôle de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'effet transcriptionnel du TRH. Le BAY K 8644, qui augmente l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$ , stimule l'accumulation des ARNm PRL et la transcription du gène de la PRL de façon dépendante de la dose, avec la même puissance que le TRH et de manière non additive à ce dernier. L'effet du BAY K 8644 est inhibé par l'antagoniste spécifique des mêmes canaux, le PN 200-110, qui décroît l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$ . On pouvait en conclure que l'activation des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L était la voie majeure de l'effet transcriptionnel du TRH. Cependant, l'antagoniste PN200-110, qui diminue l'activité transcriptionnelle basale, s'est avéré incapable d'abolir la stimulation de la transcription induite par le TRH, de même que celle induite par le TPA. On en conclut que le TRH d'une part, l'ouverture des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles au DHP d'autre part, stimulent la transcription du gène de la PRL par des voies différentes, capables d'interagir entre elles. La voie propre au TRH n'est pas identifiée pour le moment. Celui-ci pourrait moduler la conformation du canal L, le rendant insensible aux DHP.

#### *Régulation de l'expression de l'oncogène c-fos dans les cellules GH3/B6*

(D. GOURDJI, N. BUISSON)

Il a été précédemment montré que le TRH induit un accroissement précoce, transitoire et spécifique des ARNm de l'oncogène c-fos dans les cellules GH3/B6 quiescentes et que les voies intracellulaires activées par le TRH (augmentation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, activation de la protéine kinase C) sont impliquées dans cet effet du TRH sur le niveau des ARNm c-fos. On a alors recherché si l'activation de l'oncogène c-fos était couplée plus précisément à l'un des deux effets du TRH sur la sécrétion de prolactine, soit la stimulation de la libération de PRL préformée, soit la stimulation de la synthèse de PRL. On a alors comparé les effets sur le niveau des ARNm

c-fos de divers traitements agissant plus spécifiquement sur l'une ou l'autre de ces deux faces du processus sécrétoire de la PRL. Les résultats montrent un net parallélisme entre l'activation de l'expression de c-fos et la stimulation de la libération de PRL, c'est-à-dire de l'exocytose.

*Régulation hormonale de l'expression du gène de la Sécrotogranine I dans les cellules GH3/B6*

(J.N. LAVERRIÈRE, D. GOURDJI, N. BUISSON, en collaboration avec W. HUTTNER EMBL, Heidelberg)

Les sécrétogranines sont des protéines acides sulfatées présentes dans la matrice dense des grains de sécrétion des cellules endocrines et neuroendocrines. La rareté des grains de sécrétion dans les cellules GH3 posait la question d'un défaut de l'expression de ces gènes dans cette lignée d'origine tumorale. Ce problème a été abordé au niveau de l'expression du gène de la Sécrotogranine I (Sg I), en collaboration avec W. HUTTNER et à l'aide d'une sonde ADNc humaine. Ceci a révélé par Northern blot la présence d'ARNm de 2,5 kB dans les cellules GH3/B6 cultivées en conditions basales. On a alors recherché si l'expression du gène SgI était régulée par les hormones régulant l'expression du niveau des ARNm PRL. Les résultats montrent que 1. le niveau des ARNm SgI est régulé par la composition hormonale du milieu, 2. en fonction des hormones, ces régulations sont soit parallèles, soit inversées par rapport à celles observées pour les ARNm PRL. Ceci suggère que ces deux gènes sont régulés indépendamment .

*Interaction de la vitamine D (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) sur la régulation par le TRH de l'expression du gène de la prolactine*

(J.L. RICHARD, J.N. LAVERRIÈRE, N. BUISSON, D. GOURDJI)

On sait que le secostéroïde 1,25 D<sub>3</sub> intervient dans le métabolisme du calcium et il a été rapporté qu'il amplifie le pic initial du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire induit par le TRH dans une lignée parente des GH3. On a donc recherché au laboratoire les effets de divers traitements par le 1,25 D<sub>3</sub> sur l'accumulation des ARNm PRL induite par le TRH dans la lignée GH3/B6. On observe, dans tous les cas, une amplification de l'effet du TRH. En outre, en fonction des conditions de traitement, le 1,25 D<sub>3</sub> exerce soit un effet additif, soit un effet potentialisateur de celui du TRH. Ayant vérifié que ces traitements n'affectent pas les paramètres de liaison du <sup>3</sup>H-TRH, on fait l'hypothèse que le 1,25 D<sub>3</sub> agit à une ou des étapes postérieures à la liaison du TRH et que l'on tente maintenant de définir.

*Régulation de l'expression du gène humain de l'hormone de croissance par la L-triiodothyronine*

(A. MORIN, en collaboration avec le groupe de J.A. MARTIAL, Université de Liège)

A. MORIN a poursuivi, pendant plusieurs mois, au laboratoire, le travail initié au cours d'un séjour post-doctoral de longue durée dans le laboratoire de J.A. MARTIAL. L'objectif était d'analyser les mécanismes moléculaires de régulation par la L-triiodothyronine (L-T3) du gène de l'hormone de croissance humaine (hGH). Le gène hGH intact ou des gènes recombinants hybrides ont été transfectés dans les cellules GC, lignée parente des GH3 sécrétant uniquement l'hormone de croissance (rGH). Les résultats obtenus avec diverses constructions suggèrent que la T3 exerce deux effets opposés sur l'expression du gène hGH, l'un, inhibiteur, lié au promoteur, l'autre, stimulant, lié à la partie structurale.

*Distribution subcellulaire des sécrétogranines dans les cellules GH3/B6*

(C. TOUGARD, L. NASCIUTTI, R. PICART, en collaboration avec W. HUTTNER, EMBL Heidelberg).

Parallèlement à l'étude entreprise au niveau des ARNm SgI (cf. ci-dessus), on a mis en œuvre l'immunocytofluorescence et l'immunocytochimie ultra-structurale pour détecter et localiser au niveau subcellulaire les sécrétogranines dans les cellules GH3/B6 et, parallèlement, dans des cellules à PRL normales en culture primaire. On a disposé d'une batterie d'anticorps monoclonaux (A-SgI) ou polyclonaux (A-SgI, A-SgII) préparés dans le laboratoire de W. HUTTNER. Les résultats montrent que SgI et SgII sont présentes dans les rares petits grains de sécrétion des cellules GH3/B6, comme dans les nombreux et volumineux grains de sécrétion des cellules à PRL normales. Dans les deux types cellulaires, ces protéines sont en outre localisées dans les autres compartiments du processus sécrétoire, à savoir quelques citernes du reticulum rugueux et tous les saccules golgiens. La localisation simultanée des Sgs et de la prolactine montre que toutes les cellules GH3 contiennent les Sgs, alors que seulement 50-70 % d'entre elles contiennent de la PRL. Enfin, au niveau subcellulaire, on constate que des traitements hormonaux, capables d'augmenter le nombre des grains de sécrétion des cellules GH3/B6, agissent différemment sur le contenu respectif des grains en Sgs ou en PRL. Ces résultats s'accordent avec ceux recueillis au niveau des ARNm, pour suggérer une régulation indépendante de l'expression des gènes de la protéine hormonale d'une part, et des protéines de la matrice des grains d'autre part. Ils représentent le problème du rôle des Sgs dans le processus sécrétoire de la PRL.

*Effets de la laminine sur le phénotype morphologique et sécrétoire des cellules GH3/B6*

(N. BRUNET DE CARVALHO, R. PICART, S. VAN DE MOORTELE, C. TOUGARD)

N. BRUNET DE CARVALHO a précédemment montré que la laminine, composant majeur de la membrane basale du tissu adénohypophysaire, induit l'attachement solide et durable des cellules GH3/B6 cultivées en absence de sérum et modifie le phénotype morphologique des cellules qui forment des prolongements uni- ou bipolaires dont le nombre et la longueur sont amplifiés par le traitement continu par le TRH. Ces changements phénotypiques ont pu être corrélés à une augmentation significative de la sécrétion basale de PRL et une potentialisation de la réponse sécrétoire au TRH testée sous ses deux aspects : augmentation de la libération de PRL à court terme et augmentation de la production de PRL à long terme. Des éléments d'explication des mécanismes cellulaires de cet effet potentialisateur ont été apportés par une analyse ultrastructurale des prolongements cytoplasmiques dont l'extrémité dilatée présente une accumulation de grains de sécrétion contenant de la PRL, de vésicules lisses et de mitochondries. L'accumulation de ces organelles dans les dilatations terminales suggère leur transport polarisé le long des fins prolongements, selon un mécanisme analogue au transport axonal. Effectivement, les fins prolongements des cellules GH3/B6 présentent des caractères de type neuritique : faisceaux parallèles de microtubules, forte immunoréactivité pour la  $\beta$ -tubuline et présence de neurofilaments 200 kDa, également exprimés par les neurones hypothalamiques. La laminine induit donc, outre une potentialisation de l'activité sécrétoire, l'expression de potentialités neuronales qui sont masquées dans les conditions de culture classiques.

*Réorganisation du cytosquelette des cellules GH3/B6 lors de la stimulation à court terme de la libération de prolactine par le TRH*

(S. VAN DE MOORTELE, E. ROSENBAUM et C. TOUGARD)

La libération de la prolactine par exocytose de grains de sécrétion et de vésicules implique la coordination d'événements membranaires (fusions) et cytoplasmiques encore très mal compris. On attribue aux éléments du cytosquelette un rôle coordinateur dans de nombreux événements du même type. On a donc entrepris l'identification par immunofluorescence des composants majeurs du cytosquelette des cellules GH3/B6 : microtubules ( $\beta 2$  tubuline), cytokératine, vimentine et F-actine. On a ensuite constaté que le TRH induit des remaniements précoces (2-5 min) et transitoires dans la distribution de certains de ces composants ( $\beta 2$  tubuline, actine, cytokératine), selon des séquences temporelles distinctes. Ces événements sont parallèles à la redistribution intracellulaire de la PRL. On a ensuite tenté de déterminer parmi les messagers intracellulaires majeurs du TRH ( $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, protéine kinase C), ceux susceptibles d'être spécifiquement responsables de l'une de ces

altérations transitoires du cytosquelette. Les résultats ne permettent pas de différencier clairement le rôle de ces deux voies, au moins en ce qui concerne les événements les plus précoces.

*Localisation cellulaire et subcellulaire des récepteurs de la prolactine dans le tissu adénohypophysaire*

(C. TOUGARD, R. PICART, en collaboration avec P.A. KELLY, Montréal, Québec, Canada)

L'existence d'autorécepteurs à la prolactine dans les cellules antéhypophysaires a été plusieurs fois avancée sur la base d'approches indirectes. L'obtention par le groupe de P. KELLY d'anticorps monoclonaux spécifiques du récepteur de foie de rat permet une approche plus directe du sujet. Des sites de liaison des anticorps ont été détectés par immunofluorescence sur coupes semi-fines d'antéhypophysés obtenues par cryoultramicrotomie. Les techniques de double marquage ont révélé qu'ils étaient en majorité localisés dans le cytoplasme des cellules somatotropes, très rarement dans les cellules à prolactine et les cellules gonadotropes, jamais dans les cellules thyrotropes et corticotropes. Au microscope électronique sur coupes ultrafines obtenues par cryoultramicrotomie, les sites de liaison sont principalement observés au niveau des grains de sécrétion et de larges vacuoles. La présence de récepteurs de la prolactine dans les cellules somatotropes est tout à fait inattendue. La confirmation de cette localisation est actuellement recherchée par hybridation *in situ* avec la sonde ADNc isolée par P. KELLY. La signification physiologique de ces récepteurs dans les cellules somatotropes restera à élucider.

## II. DÉVELOPPEMENT DES NEURONES HYPOTHALAMIQUES

Les recherches sur le développement des neurones hypothalamiques se sont poursuivies selon les deux axes développés parallèlement depuis plusieurs années : 1. Mécanismes de la diversification des lignées neuronales et gliales, 2. Différenciation terminale des neurones hypothalamiques.

*Diversification des lignées neuronales*

(F. DE VITRY, J. HILLION, J. CATELON)

En collaboration avec M. HAMON, F. DE VITRY a poursuivi ses recherches sur le rôle des monoamines dans les stades précoces de la diversification des lignées neuronales. Elle avait précédemment montré le rôle autodifférenciateur *in vitro* de la sérotonine sur le nombre et l'activité des neurones sérotoninergiques de l'hypothalamus. Elle a maintenant recueilli des arguments expérimentaux en faveur d'un rôle analogue de la dopamine sur le

développement des neurones dopaminergiques dans des cultures hypothalamiques.

#### *Différenciation terminale des neurones hypothalamiques*

La différenciation terminale des neurones implique une succession d'étapes morphologiques depuis l'initiation et l'élongation neuritiques jusqu'à la différenciation des contacts synaptiques stabilisant le réseau neuritique. Parallèlement, se déroule un ensemble coordonné d'événements biochimiques extrêmement divers et imparfaitement connus. Nos recherches sont focalisées depuis plusieurs années sur l'ontogénèse de la fonction sécrétoire des neurones hypothalamiques. Dans ce contexte, deux aspects sont étudiés : 1. une fonction de base, l'ontogénèse du trafic vésiculaire, et 2. une fonction spécifiée, l'ontogénèse de la synthèse et la sécrétion d'un neuropeptide, la thyrolibérine.

#### *Ontogénèse du trafic vésiculaire dans les neurones en culture*

(A. TIXIER-VIDAL, A. BARRET, R. PICART)

On s'accorde pour distinguer dans les neurones deux voies vésiculaires régulées : celle des vésicules synaptiques utilisée pour le transport et la libération des neurotransmetteurs classiques, celle des vésicules à cœur dense qui stockent et transportent les neuropeptides. La biogénèse respective et les relations entre ces deux voies font l'objet d'une controverse que l'on a tenté d'éclairer par une approche ontogénétique. On a disposé d'outils immunologiques dirigés contre des protéines spécifiques de chacune de ces deux voies : la synaptophysine (B. WIEDENMANN, Berlin) pour les vésicules synaptiques et la sécrétogranine II (W. HUTTNER, Heidelberg) pour les vésicules à cœur dense. L'ontogénèse respective de ces deux protéines a été suivie simultanément par immunofluorescence et quantifiée par immunoblot. Les résultats font apparaître une dissociation importante entre ces deux marqueurs et sont en faveur d'une indépendance de ces deux voies.

#### *Maturation du précurseur du TRH au cours du développement de l'hypothalamus de souris*

(D. GROUSELLE, J. DESTOMBES, A. BARRET, P. PRADELLE, A. FAIVRE-BAUMAN)

Le TRH est un tripeptide (pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) synthétisé sous la forme d'un précurseur de 255 acides aminés dont la séquence est déduite de celle d'un ADNc connu chez le rat. Cette séquence contient 5 copies du TRH flanquées de paires d'acides aminés basiques offrant des sites potentiels de clivage et séparées par des séquences intervenantes. Ce précurseur potentiel n'a pas encore été isolé, de même que les éventuels précurseurs intermédiaires du TRH, à l'exception du précurseur direct (Gln-His-Pro-Gly) précédant l'étape d'amidation terminale. Ce problème a été abordé au laboratoire par

une stratégie classique consistant d'abord à développer des immunosérums dirigés contre des peptides de synthèse dérivés du motif Gln-His-Pro-Gly par allongement C terminal (P7) ou à la fois N et C terminal (P10). Les immunosérums ainsi obtenus, caractérisés en systèmes radioimmunologiques, reconnaissent exclusivement des peptides allongés dérivés du TRH, à l'exclusion du tripeptide mature. En outre, un radioimmunodosage du P7 et surtout un immunodosage enzymatique très sensible du P10 ont pu être établis. Ces outils ont permis d'identifier dans des fractions chromatographiques obtenues à partir d'hypothalamus de souris et de rat adultes, deux formes majeures de haut poids moléculaire : 25-35 K ou 6-8 K. L'existence de la forme 25-35 K a été confirmée par immunoréplique avec l'A-P7. Ces formes ont également été identifiées dans l'hypothalamus de fœtus de souris prélevés au 16<sup>ème</sup> jour de gestation, un stade où le TRH est déjà exprimé sous sa forme terminale.

Mettant à profit la grande sensibilité du dosage immunoenzymatique de P10, il a été ensuite possible de quantifier l'immunoréactivité associée à ce motif peptidique (IR-P10) et de la comparer au contenu en TRH, ceci à des stades croissants du développement. On a ainsi mis en évidence, au cours du développement *in vivo*, une augmentation d'un facteur 100 du rapport TRH/IR-P10 depuis le fœtus de 16 jours jusqu'à l'adulte. Ceci indique une accélération de la maturation du précurseur au cours du développement de l'hypothalamus et suggère que les formes moléculaires ainsi reconnues sont des précurseurs physiologiques de biosynthèse du TRH.

Une augmentation du rapport TRH/IR-P10 a également été observée au cours du développement neuronal *in vitro*. Ceci a suggéré de localiser simultanément par immunocytochimie, dans les neurones en culture, le TRH et le matériel précurseur immunoréactif pour P7 ou P10. J. DESTOMBES a mis au point cette double détection délicate et obtenu des résultats originaux fort intéressants. En ce qui concerne les périkaryons, trois populations neuronales ont été observées : 1. une population mineure (2 %) de petites cellules rondes positives pour le TRH exclusivement et dont la proportion ne varie pas au cours du développement, 2. une population majeure de neurones mixtes, positifs pour A-TRH et A-P7 ou A-P10, 3. une population de neurones positifs pour A-P7 ou P10 exclusivement, ne contenant donc pas de TRH et qui représentent 45 % à 18 jours de culture. La distribution respective du TRH et du précurseur le long des neurites varie en fonction de la maturation neuronale. Avant la formation des synapses et quelle que soit la réaction des somas (mixtes ou P7), la plupart des cônes de croissance contiennent exclusivement du TRH ; on observe, le long des troncs neuritiques, une augmentation progressive de l'immunoréactivité TRH. Après la formation des synapses, les varicosités et les boutons synaptiques présentent une forte immunoréactivité, soit TRH, soit P7, soit mixte, et ceci même pour des stades tardifs. Ces résultats suggèrent que la maturation du pro-TRH dans les neurones à TRH intervient à une étape post-golgienne et pendant le transport axonal.

## PUBLICATIONS

TIXIER-VIDAL A. and GOURDJI D. *Les récepteurs des neuropeptides hypothalamiques hypophysiotropes. (Annales d'Endocrinologie, 50, 379-387, 1989).*

TOUGARD C., NASCIUTTI L.E., PICART R., TIXIER-VIDAL A. and HUTTNER, W.B. *Subcellular distribution of secretogranins I and II in tumoral GH3 rat prolactin (PRL) cells as revealed by electron microscope immunocytochemistry. (J. Histochem. Cytochem. 37, n° 9, 1329-1336, 1989).*

BRUNET-DE CARVALHO N., PICART R., VAN DE MOORTELE S., TOUGARD C. and TIXIER-VIDAL A. *Laminin induces formation of neurite-like processes and potentiates prolactin secretion by GH3 rat pituitary cells. (Differentiation, 40, 106-118, 1989).*

LAVERRIÈRE J.N., RICHARD J.L., BUISSON N., MARTIAL J.A., TIXIER-VIDAL A. and GOURDJI D. *Thyroliberin and dihydropyridines modulate prolactin gene expression through interacting pathways in GH3 cells. (Neuroendocrinology, 50, 693-701, 1989).*

TOUGARD C. *Intracellular traffic of secreted peptides — A morphological point of view. (Hormone Res., 32, 13-17, 1989).*

HAMON M., BOURGOIN S., CHANEZ C. and DE VITRY F. *Do Serotonin and other neurotransmitters exert a trophic influence on the immature brain ? 12th Nestle Nutrition Workshop. Neural Development. (Edited by P.R. GUERRY, 1989).*

GONNET F., BARRET A., GROUSELLE D., and PRUNET P. *Hypothalamic control of prolactin release in the rainbow trout, *Salmogairdneri* : in vitro studies. (Fish Physiol. and Biochem. 7, 301-308, 1989).*

VAN DE MOORTELE S., ROSENBAUM E., TIXIER-VIDAL A. et TOUGARD C. *Réorganisation du cytosquelette des cellules GH3B6 lors de la stimulation à court terme de la libération de prolactine par le TRH. (Congrès de la Société de Biologie Cellulaire de France, Société de Chimie Biologique, Orsay, 27-29 septembre 1989, revue « Regard sur la Biochimie » abstr. C8. n° 3, p. 21, 1989).*

GOURDJI D., WEISMAN A., BUISSON N., and LAVERRIÈRE J.N. *c-Fos mRNA levels and PRL release are regulated in parallel in GH3B6 rat pituitary tumor cells (71th Annual Meeting of the Endocrine Society, Seattle, U.S.A., 21-25 juin 1989, abstr. 827, 1989).*

LAVERRIÈRE J.N., TIXIER-VIDAL A., TOUGARD C., BUISSON N., HUTTNER, W.B. and GOURDJI D. *Secretogranin I mRNA accumulation is hormonally regulated in GH3B6 cells and does not always parallel that of prolactin mRNA (71th Annual Meeting of the Endocrine Society, Seattle, U.S.A., 21-25 juin 1989, abstr. 1526, 1989).*

MORIN A., LOUETTE J.A., VOZ M., TIXIER-VIDAL A., BELAYEW A. and MARTIAL J.A. *Régulation de l'expression du gène humain de l'hormone de croissance par la L-triiodothyronine (XIX<sup>e</sup> Colloque Annuel de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, 12-15 septembre 1989, Rouen, Annales d'Endocrinologie, vol. 50, abstr. 120, p. 41 N, 1989).*

TOUGARD C., PICART R., TIXIER-VIDAL A. et KELLY P.A. *Les cellules somatotropes de l'antéhypophyse du rat mâle adulte contiennent des sites de fixation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de la prolactine (XIX<sup>e</sup> Colloque Annuel de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, 12-15 septembre 1989, Rouen, Annales d'Endocrinologie, vol. 50, abstr. 166, p. 53N, 1989).*

RICHARD J.L., LAVERRIÈRE J.N., BUISSON N., TIXIER-VIDAL A. and GOURDJI D. *Interaction of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on TRH-induced prolactin (PRL) gene expression in a rat pituitary cell line (GH3B6) (Colloque Annuel de la Société de Biologie Cellulaire de France, 13-14 mars 1990, abstr. 36, Paris)*

TIXIER-VIDAL A. and FAIVRE-BAUMAN A. *The use of hypothalamic cell cultures to study role of diffusible factors in phenotypic expression on central nervous system neurons. (Methods in Neurosciences, Academic press, volume 2, pp. 355-371, 1990).*

GROUSELLE D., DESTOMBES J., BARRET A., PRADELLES P., LOUDES C., TIXIER-VIDAL A. and FAIVRE-BAUMAN A. *Evidence for high molecular weight immunoreactive TRH precursor forms in the developing mouse hypothalamus. Simultaneous immunolocalization with TRH in cultured neurons. (Endocrinology, 126, 2454-2464, 1990).*

MORIN A., LOUETTE J., VOZ M.L.J., TIXIER-VIDAL A., BELAYEW A., and MARTIAL J.A. *Triiodothyronine inhibits transcription from the human growth hormone promoter (Mol. Cell Endocrinol., 71, 261-267, 1990).*

#### CONGRÈS

71th Annual Meeting of the Endocrine Society, Seattle, U.S.A., juin 21-25, 1989, Communications sur panneau. D. GOURDJI, J.N. LAVERRIÈRE, A. TIXIER-VIDAL.

Second International Pituitary Congress, Palm Springs, U.S.A., juin 25-28, 1989. Communications sur panneau. D. GOURDJI, J.N. LAVERRIÈRE.

37th Meeting of the European Tissue Culture Society, Graz, Autriche, 29 août-1<sup>er</sup> septembre 1989. D. GOURDJI, Chairperson Table Ronde « Reorganization of the cytoskeleton of endocrine cells in response to hormone ».

XIX<sup>e</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Réunion Franco-Canadienne, Rouen, 12-15 septembre 1989. D. GOURDJI, D. GROUSELLE, J.N. LAVERRIÈRE, A. MORIN, A. TIXIER-VIDAL, C. TOUGARD.

XVI<sup>e</sup> congrès des Jeunes Chercheurs, Sophia-Antipolis, septembre 1989. J.L. RICHARD.

Colloque commun de la Société de Biologie Cellulaire de France et de la Société de Chimie Biologique « Mécanismes Cellulaires et Moléculaires de la Sécrétion », Orsay, 27-29 septembre 1989. N. BRUNET DE CARVALHO, L.E. NASCIUTTI, A. MORIN, A. TIXIER-VIDAL, C. TOUGARD, S. VAN DE MOORTELE, E. VILA-PORCILE.

9<sup>e</sup> Congrès Français d'Endocrinologie, Strasbourg, 12-14 octobre 1989, D. GOURDJI (Symposium Neuropeptides et cellules antéhypophysaires).

Journées de l'ARC, Paris, 15-16 décembre 1989. D. GOURDJI.

Congrès de la Société de Biologie Cellulaire de France sur « Mécanismes de la différenciation — Oncogènes, Protooncogènes, et Facteurs de croissance » Paris, 13-14 mars 1990. N. BRUNET DE CARVALHO, D. GOURDJI, J.N. LAVERRIÈRE, A. MORIN, J.L. RICHARD, C. TOUGARD, A. TIXIER-VIDAL, E. VILA-PORCILE, F. DEVITRY.

Colloque I.N.S.E.R.M. « Analyse d'images biologiques en microscopie optique et électronique », Reims, 3-5 avril 1990. R. PICART et C. TOUGARD.

2nd International Congress of Neuroendocrinology, Bordeaux, 24-29 juin 1990. A. BARRET, D. GOURDJI, D. GROUSELLE, J. HILLION, J.N. LAVERRIÈRE, A. TIXIER-VIDAL - F. DE VITRY, Chairman Symposium « Development - Growth Factors ».

#### CO-ORGANISATION DE CONGRÈS

Colloque commun de la Société de Biologie Cellulaire de France et de la Société de Chimie Biologique « Mécanismes Cellulaires et Moléculaires de la Sécrétion », Orsay, 27-29 septembre 1989. C. TOUGARD.

XIX<sup>e</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Réunion Franco-Canadienne, Rouen, 12-15 septembre 1989. D. GOURDJI.

1<sup>er</sup> Colloque de la Société Française de Culture de Tissus et de Cellules. Interactions cellulaires et modèles tissulaires « in vitro », Paris, 2 juin 1989. D. GOURDJI.

Réunions pluriannuelles du Cercle Amical des Neuroendocrinologistes de l'Île de France. D. GOURDJI.

Second International Congress of Neuroendocrinology, Bordeaux, 24-29 juin 1990, A. TIXIER-VIDAL, Membre du Conseil Scientifique.

## SÉMINAIRES

D. GROUSELLE, 2 novembre 1989, Journées Scientifiques de L'Institut de Biologie du Collège de France

A. TIXIER-VIDAL, Berkeley, 28 juin 1989, Department of Molecular and Cellular Biology, Université de Californie.

E. VILA-PORCILE, Jouy-en-Josas, 24 novembre 1989, Laboratoire de Physiologie Animale, I.N.R.A., Service de Microscopie Electronique.

## ENSEIGNEMENT

## D. GOURDJI

— Certificat de Pharmacologie Endocrinienne, Faculté de Médecine Lariboisière-St Louis, Université de Paris VII, « Culture des cellules antéhypophysaires » 2 avril 1990, « le TRH » 10 avril 1990.

— Module de Neuroendocrinologie Cellulaire, Maîtrise de Neurobiologie Cellulaire, Université de Paris VI, Faculté des Sciences : 12 heures de cours de mars à mai 1990.

## A. TIXIER-VIDAL

— D.E.A. de Physiologie de la Reproduction, Paris VI, décembre 1989.

— D.E.A. d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire, C.H.U. Kremlin Bicêtre, décembre 1989.

## C. TOUGARD

— Cours dans le cadre des certificats C 2 et C' 2 de Biologie Cellulaire et Moléculaire. Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales. Faculté de Médecine, Saint-Antoine, Paris VI, janvier 1990.

— Séminaire méthodologique dans le cadre du D.E.A. d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire, C.H.U. Kremlin Bicêtre, mai 1990.

## THÈSE

Simone KHOUZAM, thèse de Doctorat en Médecine, 2 octobre 1989, Faculté de Médecine Necker Enfants Malades.