

## Physiologie cellulaire

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

### RÉSUMÉ DU COURS

Cette année à nouveau, le cours de physiologie cellulaire a été consacré à l'analyse de la segmentation fonctionnelle du tubule rénal, en particulier à celle du tubule proximal (qui n'avait pas été achevée l'année dernière), puis à celle du segment grêle du néphron.

Rappelons que le fluide tubulaire s'écoulant dans les principaux segments tubulaires successifs qui constituent le néphron subit, dans chacun d'eux, des modifications qualitatives et quantitatives de sa composition et de son débit. Ces modifications résultent des processus de réabsorption et de transport effectués spécifiquement par les cellules épithéliales qui forment les parois de ces segments. Or, il est aujourd'hui expérimentalement établi que les portions successives d'un même segment du néphron présentent des propriétés variables soit quantitativement — c'est le cas du tubule proximal et du segment de dilution — soit même qualitativement — c'est le cas du segment grêle et du tubule collecteur.

La nature des différences observées, leur signification physiologique et les mécanismes moléculaires qui peuvent en rendre compte ont constitué l'objet de ce cours.

\*

\*\*

Dans le cas du tubule proximal examiné d'abord, il a été rappelé qu'en valeur absolue, le taux de réabsorption isoosmotique par unité de longueur diminue progressivement entre le début de la *pars convoluta* et la fin de la *pars recta*. Comme le facteur principal de cette réabsorption volumique est représenté par la réabsorption préférentielle d'ions  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{Na}^+$  (un processus qui entraîne l'acidification du fluide tubulaire), l'attention a été portée, dans un premier temps, sur le fonctionnement de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  luminal. Comme cela a été discuté l'an dernier, le transport du bicarbonate n'a

pas pour facteur limitant la baisse du pH et de  $[\text{HCO}_3^-]$  le long du tubule proximal ; en fait la diminution du transport résulte principalement d'une diminution de la capacité intrinsèque des transporteurs impliqués (échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans les membranes luminales et cotransporteur  $1 \text{Na}^+/3 \text{HCO}_3^-$  dans les membranes basolatérales). En réponse à une acidose métabolique imposée, l'expression de ces deux transporteurs augmente, mais la différence entre segments proximaux initiaux et tardifs subsiste. Dans le rein adulte, il existe donc une certaine plasticité du niveau d'expression de ces transporteurs : ainsi peuvent se réaliser des régulations adaptatives dont l'hétérogénéité axiale du transport de bicarbonate est probablement l'un des aspects.

La réabsorption proximale du phosphate présente également une hétérogénéité axiale dont les caractéristiques ont été discutées : Le cotransporteur apical électroneutre  $1 \text{HPO}_4^{2-} - 2 \text{Na}^+$  présente les mêmes caractéristiques cinétiques tout au long du tubule proximal (M. Levi, 1990 : *Am. J. Physiol.*, 258, F1616), mais la vitesse maximale est plus élevée dans les segments initiaux. L'hormone parathyroïdienne, via l'AMP cyclique, inhibe davantage le transport de phosphate dans la *pars recta* que dans la *pars convoluta*, alors que les effets inhibiteurs de la même hormone sur le transport de bicarbonate dans ces deux portions proximales sont inverses. D'autre part, un régime carencé en phosphate induit, en quelques heures, une expression très augmentée et sélective du cotransporteur  $\text{Na}/\text{Pi}$  (résistant à l'action phosphaturiante de la PTH).

A l'inverse, l'acidose métabolique, qui stimule le transport du bicarbonate, inhibe celui du phosphate ; ces effets de l'acidose sont probablement médiés par une augmentation plasmatique des glucocorticoïdes, car l'administration de dexaméthasone produit les mêmes effets. Des travaux récents suggèrent que l'effet inhibiteur de la PTH sur l'échangeur  $\text{Na}/\text{H}$  du tubule proximal résulterait de la phosphorylation, par la protéine kinase A (cAMP-dépendante), d'une sous-unité de 42 K Da régulatrice de l'échangeur  $\text{Na}/\text{H}$  (Weinman et al., 1990 : *Am. J. Physiol.*, 258, F1254). Au contraire, la phosphorylation de l'échangeur par la protéine kinase C stimulerait son activité ; rappelons que l'angiotensine II et les agonistes  $\alpha_1$  adrénergiques, dont les effets s'exercent généralement via la formation d'inositol tris phosphate et de diacylglycerol, possèdent des récepteurs membranaires dans les segments précoces des tubules proximaux et y stimulent la réabsorption du bicarbonate.

Les hormones mentionnées ci-dessus contrôlent non seulement le niveau d'expression ou le niveau d'activité des systèmes de transport dans le PCT, mais également deux activités métaboliques propres à ce segment tubulaire, à savoir l'ammoniagénèse et la gluconéogénèse. Il faut rappeler que ces deux activités métaboliques contribuent bien plus aux fonctions d'excrétion du rein qu'à la régulation du métabolisme énergétique des cellules proximales. On sait en effet que la synthèse d'ATP dans le tubule proximal n'est pas couplée à l'oxydation phosphorylante du glucose puisque ce segment est pratiquement

dépourvu des principaux enzymes impliqués dans la glycolyse aérobie, notamment l'hexokinase. Par contre, le tubule proximal est le seul à contenir de la PEPCK, l'enzyme principal de la gluconéogenèse.

Le couplage existant entre fonction de réabsorption et gluconéogenèse a été récemment étudié par Nagami et Lee (*Am. J. Physiol.* (1989) : 256, F120) sur des tubules proximaux perfusés in vitro. Les auteurs ont observé que la production métabolique de glucose diminuait lorsque le débit de microperfusion (et le taux de réabsorption isoosmotique) augmentait. La suppression de la réabsorption par application d'amiloride ou d'ouabaine est accompagnée d'une augmentation importante de production de glucose. L'addition dans le milieu de substrats ammoniacaux (notamment de glutamine) stimule davantage la gluconéogenèse que celle de substrats non ammoniacaux (lactate, pyruvate, acétate). Bien que le mécanisme exact de couplage entre transport et synthèse de glucose n'ait pas été établi, il est acquis que, dans les conditions normales de fonctionnement du tubule proximal, le glucose réabsorbé à travers les membranes apicales par un mécanisme de cotransport électrogénique Na<sup>+</sup>-glucose s'accumule dans la cellule d'où il diffuse vers le plasma par un simple processus passif de diffusion facilitée, avec le glucose synthétisé par gluconéogenèse.

Signalons enfin que l'ammoniogenèse et la gluconéogenèse proximales, comme le transport de bicarbonate, sont soumis à un contrôle hormonal stimulateur exercé par les glucocorticoïdes, qui, par contre, inhibent le transport de phosphate. Il semble établi que ces stéroïdes agissent en modulant l'expression des gènes correspondants. Ceci a été démontré dans le cas des deux enzymes limitants, la glutaminase phosphate-dépendante mitochondriale, dans le cas de l'ammoniogenèse, et la phosphoenolpyruvate carboxykinase dans le cas de la gluconéogenèse, dont les mRNA augmentent en réponse à la dexaméthasone.

Les réabsorptions respectives du glucose et des acides aminés manifestent également une hétérogénéité axiale qui a été brièvement discutée au cours. Il en va de même pour la sécrétion des acides organiques par le tubule proximal. Au cours du développement ontogénique du rein, l'induction des systèmes de transport peut être durablement renforcée en injectant aux jeunes animaux les acides organiques correspondants (par exemple du PAH ou de la pénicilline).

\*

\*\*

La deuxième partie du cours a été consacrée à la segmentation fonctionnelle du segment grêle des néphrons. La localisation de cette portion tubulaire dans les régions profondes du rein, la faible épaisseur de l'assise cellulaire qui en constitue les parois, ainsi que la grande différence de longueur du segment grêle d'un néphron à l'autre ont longtemps représenté des obstacles à leur

étude expérimentale directe. Et pourtant leur rôle essentiel dans le mécanisme de concentration de l'urine par contre-courant dans les régions médullaires du rein est reconnu depuis longtemps, même si les mécanismes sous-jacents ont donné lieu à des interprétations différentes selon les espèces animales et la nature des informations indirectes prises en compte. Dans les années récentes cependant, les différents segments successifs dont sont formés les segments grêles les plus longs ont pu être microperfusés séparément *in vitro* et leurs propriétés de perméabilité étudiées avec précision.

Rappelons que, pour tous les néphrons, le segment grêle commence à la jonction entre zone externe et zone interne de la médullaire externe, là où la *pars recta* du tubule proximal prend fin. Puis le segment grêle suit l'axe cortico-médullaire pour se terminer à la jonction entre médullaire interne et médullaire externe, là où débute le segment large ascendant (segment de dilution). Dans le cas des néphrons superficiels, qui ne pénètrent pas dans la médullaire interne (néphrons à anse courte), le segment grêle est limité à une courte portion descendante qui traverse la zone interne de la médullaire externe. Dans le cas des néphrons à anse longue, au contraire, les segments grêles pénètrent plus ou moins profondément dans la médullaire interne (et jusqu'à la pointe de la papille pour certains d'entre eux), puis se replient en épingle à cheveux pour remonter jusqu'à la jonction entre médullaire interne et externe. Le segment grêle de tels néphrons à anse longue comporte 3 portions successives, à savoir : une portion descendante localisée dans la médullaire externe ; une portion descendante localisée dans la médullaire interne et une portion ascendante (également localisée dans la médullaire interne). Signalons enfin que, dans la médullaire externe, la portion grêle des néphrons à anse courte possède un épithélium de morphologie et de propriétés différentes de celui des néphrons à anse longue. Dans celui des anses courtes (épithélium de type I), les cellules sont très plates et forment des jonctions intercellulaires de type « serré ». Au contraire, celui des anses longues (épithélium de type II) comporte des cellules plus épaisses, assez riches en organelles et en microvillosités, et qui sont reliées par des jonctions de type « lâche ». Ces aspects caractéristiques de l'épithélium de type II sont surtout prononcés chez les espèces dont le rein a un pouvoir élevé de concentration de l'urine (par exemple le hamster). Dans la médullaire interne, l'épithélium de la branche grêle descendante des anses longues se transforme progressivement en un type III comportant à nouveau des cellules aplaties et des jonctions « serrées », qui rappelle le type I. Enfin, à partir de la pointe des anses, la portion ascendante des anses comporte, chez toutes les espèces, un épithélium de type IV caractérisé par des cellules aplaties et extrêmement interdigitées, dont les très nombreuses jonctions sont du type « lâche ». Les propriétés de perméabilité de ces 4 types d'épithélium ont été établies pour le hamster au cours des dernières années et sont en bonne corrélation avec les données morphologiques.

La perméabilité à l'eau,  $L_p$ , est élevée dans les épithélia de types I, II et III mais plus de 100 fois plus basse dans le type IV, qui est virtuellement imperméable à l'eau. Par contre, la perméabilité au sodium,  $P_{Na}$ , est basse dans les épithélium qui ont des jonctions « serrées » (types I et III), mais élevée (plus de 20 fois supérieure) dans ceux qui ont des jonctions « lâches » (types II et IV). Enfin, la perméabilité à l'urée est 5 à 10 fois plus faible dans le type II que dans les 3 autres types d'épithélium, alors que la perméabilité au chlorure est faible dans tous les segments ( $P_{Na}/P_{Cl} \approx 5$ ), sauf le segment de type IV où elle est remarquablement élevée ( $P_{Na}/P_{Cl} < 0,5$ ). Aucun des 4 segments n'est capable d'effectuer de transport actif de sodium ou de développer une différence de potentiel transépithéliale lorsqu'il est perfusé avec des solutions symétriques.

Ces résultats sont compatibles avec les fonctions d'équilibration passives suivantes, lorsque le fluide tubulaire circule dans des régions médullaires d'osmolarité extracellulaire croissante en direction de la papille (due à l'accumulation par contre-courant de Na Cl et d'urée dans le liquide interstitiel). Pour les segments grêles des néphrons à anse courte (épithélium de type I) l'équilibre se fait surtout par sortie osmotique d'eau, et en partie par entrée d'urée. Dans le cas des néphrons à anse longue, l'équilibration osmotique se produit, dans la médullaire externe (épithélium de type II), à la fois par sortie nette d'eau et par entrée nette de soluté, principalement de sel ; puis, dans la médullaire interne (épithélium de type III), par sortie d'eau et par entrée nette d'urée. Enfin, dans le segment grêle ascendant (épithélium du type IV), une importante sortie nette de Na Cl, partiellement compensée par une entrée nette d'urée, mais sans flux osmotique d'eau, a pour effet d'abaisser la pression osmotique du fluide tubulaire au dessous de celle de l'interstitium, en accord avec l'hypothèse avancée de longue date par Kokko et Rector (1972). L'ensemble de ces données permet de mieux appréhender le rôle des anses grêles dans le mécanisme de concentration de l'urine par le rein.

\*  
\*\*

Enfin, la dernière partie du cours a été consacrée à la discussion de certains aspects de la segmentation fonctionnelle du segment de dilution des mammifères, la branche ascendante large de l'anse de Henle. Les processus de réabsorption d'ammonium et de sécrétion de protons récemment découverts dans ce segment ont été rappelés. En particulier, il a été souligné que c'est l'imperméabilité de la membrane cellulaire apicale vis-à-vis de la diffusion non ionique du  $NH_3$  qui est à l'origine de la vectorialisation du flux net de  $NH_4^+$  dans le sens de la réabsorption.

La réabsorption des ions  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  qui se produit dans ce segment est sous le contrôle de plusieurs hormones qui la stimulent via la production de cAMP. Des expériences récentes effectuées par microperfusion tubulaire *in vitro* ont permis de montrer que les effets de ces hormones sont

qualitativement différents dans les portions corticale et médullaire de ce segment chez la souris. Les hormones n'augmentent que le transport de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans la portion médullaire, tandis qu'elles stimulent aussi celui des cations divalents  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  dans la portion corticale. Ces résultats révèlent donc une segmentation fonctionnelle qui pourrait résulter d'une différence de perméabilité des jonctions intercellulaires dans les deux portions vis-à-vis des cations divalents. Sur le plan physiologique, l'absence de réabsorption nette d'ions  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  dans la portion médullaire du segment de dilution indique que ces ions ne participent pas prioritairement au recyclage ionique qui se produit dans le processus de concentration de l'urine par contre-courant.

F.M.

#### PROGRAMME DES SÉMINAIRES

9 novembre : Daniel RICQUIER (Centre de Recherche sur la Nutrition, Meudon) : La protéine découplante des mitochondries du tissu adipeux brun.

16 novembre : Adrien BINET (Université Paris-Sud, Orsay) : Régulation hormonale du calcium intracellulaire dans les hépatocytes.

23 novembre : Alexandre EDELMAN (CHU Necker-Enfants Malades, Paris) : Purification et reconstitution du canal chlore d'origine rénale et trachéale.

30 novembre : Robert BAROUKI (Hôpital Henri Mondor, Créteil) : Régulation hormonale du gène de l'aspartate aminotransférase cytosolique.

7 décembre : Frank BORGESE (Laboratoire Jean Maetz, CEA, Villefranche-sur-Mer) : Régulation de l'échangeur sodium-proton AMP cyclique-dépendant du globule rouge de Truite.

14 décembre : Sophie LOTERSZTAJN (Hôpital Henri Mondor, Créteil) : Les effets biologiques du fragment 19-29 du glucagon, le minuglucagon.

11 janvier : François ALHENC-GELAS (INSERM U.36, Paris) : L'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le rein et la circulation : aspects moléculaires et physiologiques.

18 janvier : Jean-François DECAUX (Centre de Recherche sur la Nutrition, Meudon) : Régulation de l'expression du gène de la glucokinase dans les hépatocytes en culture primaire.

25 janvier : Bernard ROSSIGNOL (Université Paris-Sud, Orsay) : Neurokinines et mécanismes de transduction impliqués dans les processus sécrétoires dans la glande parotide.

## TRAVAUX DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

## I. ISOFORMES RÉNALES DE LA Na-K-ATPase

(A. DOUCET, C. BARLET-BAS, L. CHEVAL, S. MARSY, en collaboration avec E. ARYSTARKHOVA de l'Académie des Sciences, Moscou, URSS)

Il est aujourd'hui bien établi qu'il existe au moins trois isoformes de la sous-unité catalytique de la Na-K-ATPase ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ) qui présentent des propriétés cinétiques différentes. Ainsi  $\alpha_3$  est plus affine que  $\alpha_1$  pour le sodium et pour l'ouabaïne. Ces différentes isoformes semblent être spécifiquement exprimées dans certains tissus mais pas dans d'autres. Ainsi le cerveau possède à la fois  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  alors que le rein ne posséderait que la forme  $\alpha_1$  de faible affinité.

Cependant, des travaux précédemment effectués au laboratoire ont montré que la Na-K-ATPase présente dans les segments terminaux du néphron (le tubule collecteur) est plus sensible à l'ouabaïne (*J. Biol. Chem.*, 261 : 12526-12533, 1986) et au sodium (*Am. J. Physiol.*, 259 : F246-F250, 1990) que celle des segments plus proximaux. Ces résultats suggéraient que le tubule collecteur pourrait exprimer l'isoforme  $\alpha_3$  alors que les autres segments du néphron (qui sont majoritaires) exprimeraient  $\alpha_1$ .

Pour démontrer cette hypothèse, nous avons entrepris, en collaboration avec Madame E. Arystarkhova, de rechercher les effets d'un anticorps spécifique anti- $\alpha_3$  sur l'activité Na-K-ATPase des différents segments du néphron de lapin. En effet, outre sa très grande spécificité de liaison pour l'isoforme  $\alpha_3$  par rapport aux isoformes  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , cet anticorps possède la propriété d'inhiber l'activité Na-K-ATPase.

Les résultats indiquent clairement que cet anticorps n'a aucun effet sur l'activité Na-K-ATPase du tubule proximal, de la branche large ascendante de l'anse de Henle, du tubule contourné distal et du segment connecteur alors qu'il inhibe à plus de 95 % son activité dans le tubule collecteur. Ces résultats confirment donc la présence de l'isoforme  $\alpha_3$  dans le tubule collecteur. Cette propriété a des implications fonctionnelles importantes puisqu'elle confère à ce segment des propriétés spécifiques de régulation de la synthèse de la Na-K-ATPase en plus de sa spécificité vis-à-vis d'éventuels analogues de l'ouabaïne. Rappelons à ce propos que c'est exclusivement dans ce segment du néphron que nous avons montré que la Na-K-ATPase est induite en réponse à l'aldostérone (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 1707-1711, 1988).

## II. INTERACTIONS ENTRE L'ALDOSTÉRONNE ET DES DÉRIVÉS (C<sub>18</sub>) DE LA PROGESTÉRONNE AU NIVEAU RÉNAL

(C. BARLET-BAS, L. CHEVAL, A. DOUCET, en collaboration avec M.E. RAFESTIN-OBLIN, INSERM U 33 et A. VIGIER, URA 493 CNRS)

Les dérivés 18-vinylprogestérone (18-VP) et 18-éthynylprogestérone (18-EP) récemment synthétisés sont des inhibiteurs puissants de la synthèse d'aldostérone par les glandes surrénales. Pour évaluer le rôle possible de ces deux agents dans la thérapie de l'hypertension, nous avons recherché s'ils interagissaient aussi avec les récepteurs rénaux des minéralocorticoïdes, et dans l'affirmative, s'ils étaient agonistes ou antagonistes de l'effet antinatriurétique de l'aldostérone. Pour cela nous avons déterminé l'efficacité du 18-VP et du 18-EP pour : 1 - déplacer la liaison de <sup>3</sup>H-aldostérone sur des fractions cytosoliques de rein de rat, et 2 - interférer avec la stimulation par l'aldostérone de la Na-K-ATPase du tubule collecteur de rat. Les propriétés de ces deux composés ont été comparées à celles de leur précurseur, la progestérone, et de la spironolactone, un antiminéralocorticoïde très efficace.

Tous les composés testés déplacent la liaison de <sup>3</sup>H-aldostérone sur les récepteurs des minéralocorticoïdes, avec les efficacités suivantes : spironolactone > aldostérone > progestérone > 18-VP > 18-EP ; les K<sub>d</sub> apparents varient entre 0,7 nM et 16 nM.

La spironolactone, la progestérone et le 18-VP antagonisent la stimulation de la Na-K-ATPase induite par l'aldostérone alors que le 18-EP reproduit l'effet de l'aldostérone. Ces différents stéroïdes modifient l'activité Na-K-ATPasiqne et la liaison d'aldostérone avec des affinités comparables.

Ces résultats laissent présumer que le 18-VP, qui inhibe la synthèse d'aldostérone et son action périphérique, pourrait représenter un agent antihypertensif, à condition qu'il n'ait pas d'effets secondaires.

## III. CARACTÉRISATION ET LOCALISATION D'UNE Na-ATPase INSENSIBLE À L'OUABAÏNE LE LONG DU NEPHRON DE RAT

(C. BARLET-BAS, C. KHADOURI, S. MARSY, L. CHEVAL, A. DOUCET, en collaboration avec G. EL MERNISSI, Faculté des Sciences, Marrakech, Maroc)

Plusieurs auteurs ont démontré l'existence d'une ATPase stimulée par le sodium mais insensible à l'ouabaïne dans la membrane basolatérale de cellules de cortex rénal de rat. Cette activité apparaît lorsque ces membranes sont conservées à froid pendant quelques jours ou lorsque les propriétés du milieu de préparation des membranes (en particulier son pH et sa concentration en calcium) sont modifiées. Notre but a été : 1 - de rechercher si une telle



activité peut être mesurée sur des cellules intactes de rein de rat et de définir ses propriétés cinétiques, 2 - de localiser cette ATPase le long du néphron, et 3 - de déterminer le mécanisme d'action du pH et des ions  $\text{Ca}^{2+}$  sur cette activité.

En fait, nous avons caractérisé deux activités ATPasiques sensibles au sodium et insensibles au potassium et à l'ouabaine : une activité stimulée par le Na et une activité inhibée par le sodium. L'activité inhibée par le sodium est présente dans le tubule proximal et l'anse large ascendante de Henle mais est absente du tubule collecteur alors que l'activité stimulée par le sodium est exclusivement présente dans le tubule proximal. L'ATPase inhibée par le sodium, mais pas celle stimulée, est totalement abolie en présence de  $\text{Ca}^{2+}$   $100\mu\text{M}$ . Inversement, l'ATPase stimulée par le sodium, mais pas celle inhibée, est abolie lorsque les segments de néphron sont préincubés à pH acide. Dans ces conditions, seule l'ATPase stimulée par le sodium peut être fonctionnelle dans des conditions physiologiques normales. Cette ATPase présente une affinité apparente d'environ 10 mM pour le sodium et est inhibée de façon dose-dépendante ( $K_{50} \sim 6,10^{-6}$  M) par la triflocine. Le rôle éventuel de cette ATPase dans le transport de sodium au niveau proximal n'a pas été étudié à ce jour.

#### IV. DISTRIBUTION DES ENZYMES DU CYCLE DE L'URÉE DE LONG DU NEPHRON

(A. HUS-CITHAREL, F. MOREL, en collaboration avec O. LEVILLAIN,  
et L. BANKIR, U.90, Hôpital Necker)

Bien qu'il soit couramment admis que l'urée excrétée par le rein est entièrement produite dans le foie, on sait cependant que le rein synthétise de l'arginine et contient de l'arginase susceptible de la dégrader pour produire de l'ornithine et de l'urée. Dans un précédent rapport d'activité (1988-1989), nous avons indiqué le principe d'une microtechnique simple permettant (in vitro et sur segments tubulaires uniques isolés par microdissection) de mettre en évidence la production d'urée  $^{14}\text{C}$  à partir d'arginine marquée [L-(guanido- $^{14}\text{C}$ ) Arginine]. En présence d'uréase ajoutée au milieu de survie, l'urée produite est hydrolysée et le  $^{14}\text{CO}_2$  formé est recueilli dans une gouttelette de KOH et compté. Il a été montré, grâce à cette microméthode, que les segments du néphron qui produisent le plus d'urée chez le rat sont la *pars recta* du tubule proximal (0,25 pmoles/min/mm) et la partie médullaire du tubule collecteur (0,1 à 0,15 pmoles/min/mm).

Une étude similaire a été effectuée chez d'autres espèces de mammifères, qui a montré des différences marquées, qualitatives et quantitatives, d'une espèce à l'autre. Chez toutes, cependant, on note une production maximale dans la portion terminale de la *pars recta* proximale. En valeur absolue, cette

production décroît selon l'ordre suivant : méridien (une espèce désertique), rat, souris, chat, lapin. On notera que cet ordre est en corrélation avec le pouvoir de concentration de l'urine par le rein chez ces espèces.

Les sites de synthèse d'arginine dans le rein (à partir de citrulline et d'aspartate) ont pu être également étudiés à l'aide d'une micro-méthode analogue à la précédente, mais dans laquelle le milieu d'incubation des tubules individuels en survie contient de la citrulline marquée [L-(ureido- $^{14}\text{C}$ ) citrulline], de l'aspartate, ainsi que de l'arginase et de l'uréase pour transformer l'arginine marquée relarguée dans le milieu en urée marquée et en  $^{14}\text{CO}_2$ . Il a été observé chez toutes les espèces étudiées que le tubule proximal est le site majeur de synthèse d'arginine. Mais, à la différence de l'enzyme dégradant l'arginine, celles qui sont impliquées dans sa synthèse à partir de citrulline sont localisées principalement dans la portion contournée du tubule proximal et non dans sa *pars recta*. Il existe donc, le long du néphron, une dissociation marquée des sites de synthèse et de dégradation de l'arginine ; ceux-ci ne se recouvrent que dans les zones médianes du tubule proximal (segment  $\text{S}_2$ ). Cette observation a pu être confirmée par des expériences dans lesquelles la production d'urée à partir de citrulline par les cellules tubulaires a été mesurée comme ci-dessus en omettant de mettre l'arginase dans le milieu d'incubation : dans cette condition particulière, on observe effectivement que la portion médiane du tubule proximal produit des quantités notables d'urée, alors que ni la portion initiale (faute de contenir de l'arginase), ni la portion terminale (faute de synthétiser l'arginine) ne produisent d'urée.

Signalons enfin que l'ornithine formée en même temps que l'urée sous l'action de l'arginase, peut être décarboxylée par une ornithine decarboxylase pour générer des polyamines. Des expériences préliminaires utilisant la ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ ) ornithine sur tubules isolés en survie *in vitro* ont permis de montrer que cette enzyme est effectivement présente dans les segments tubulaires proximaux, notamment ceux qui contiennent de l'arginase (*pars recta*).

## V. ACTION DES AGONISTES CHOLINERGIQUES SUR LE CALCIUM INTRACELLULAIRE

(J. MARCHETTI, F. LEBRUN, F. MOREL)

Dans notre précédent rapport, nous avons indiqué que l'emploi de Fura 2 comme sonde fluorescente pour mesurer la concentration de calcium ionisé intracellulaire nous avait permis de montrer sur des fragments tubulaires uniques superfusés *in vitro* que l'application d'agonistes cholinergiques induit, sur le canal collecteur médullaire de rat, une augmentation biphasique du calcium qui est supprimée par les inhibiteurs des récepteurs muscariniques.

Depuis lors, la même méthode a été mise en œuvre sur des glomérules individuels chargés de Fura 2. Sur cette structure également, le carbachol induit une augmentation biphasique du calcium comportant un pic initial très prononcé suivi d'un plateau qui se maintient tant que le carbachol est présent. Ces effets peuvent être répétés plusieurs fois sur la même structure sans désensibilisation marquée. Le pic correspond à la libération de calcium à partir d'organelles intracellulaires, et le plateau à l'entrée de calcium extracellulaire par des canaux calciques membranaires non voltage dépendants. Le plateau de la réponse montre une sensibilité vis-à-vis des agonistes muscariniques plus grande que le pic. La microdissection permet de séparer le feuillet pariétal de la capsule de Bowman du reste du glomérule ; ces deux structures ont donc pu être étudiées individuellement. Toutes deux contiennent des récepteurs muscariniques ; sur le feuillet isolé, la réponse obtenue comporte, comme pour le glomérule complet, un pic très marqué et un plateau ; sur le glomérule sans feuillet pariétal, par contre, le pic initial est très discret mais le plateau subsiste. Comme le feuillet pariétal contient un seul type cellulaire — des cellules épithéliales aplaties et ciliées — auxquelles aucune fonction n'est assignée autre que celle de paroi inerte, l'observation de récepteurs muscariniques couplés à une augmentation de calcium est inattendue et pose la question de la nature de l'action physiologique que pourrait exercer sur cette structure les neuromédiateurs cholinergiques. Des résultats récents et préliminaires suggèrent qu'il s'agit d'une réponse contractile.

*VI. ACTION DES AGONISTES CHOLINERGIQUES SUR LE MÉTABOLISME DES PHOSPHOINOSITIDES DANS LE GLOMÉRULE*  
(R.M. RAJERISON, P. MENETON, M. BLOCH-FAURE et D. CHABARDES, en collaboration avec G. GUILLON, Centre CNRS-INSERM de Pharmacologie-Endocrinologie, Montpellier)

On sait que diverses hormones et modulateurs de l'activité cellulaire agissent (par l'intermédiaire de récepteurs couplés à la phospholipase C, PLC) en produisant de l'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) et du diacylglycerol (DAG) comme 2<sup>es</sup> messagers. Nous nous sommes attachés à miniaturiser les techniques disponibles d'étude du métabolisme des phosphoinositides ( $PI_2$ ) afin de les appliquer à des segments de néphron fraîchement isolés et morphologiquement bien définis. La microméthode a été mise au point sur des glomérules rénaux ; elle permet de quantifier les différents produits de ce métabolisme dans seulement quelques centaines de cellules (1 seul glomérule) après marquage en présence de myoinositol tritié ( $0,5 \mu Ci/\mu l$ ,  $100 Ci/mmol$ ). Nous avons observé que les différents « pools » cellulaires [inositol libre (I), inositol phosphates ( $IP_3$ ) et phosphoinositides ( $PI_2$ )], participant au métabolisme des  $PI_2$ , ont la propriété de s'équilibrer entre eux en moins de 2 heures dans le

glomérule intact. Ceci permet l'étude du métabolisme des  $PI_s$  dans de bonnes conditions. Parmi les agonistes que nous avons testés, trois stimulent fortement la  $PLc$  : le PAF, l'endothéline (I ou III) et le carbachol. L'effet du carbachol est nouveau. Contrairement aux cellules mésangiales en culture, le glomérule intact ne répond que très faiblement à l'angiotensine et pas du tout à la vasopressine.

L'effet du carbachol est supprimé par la pirenzépine (un inhibiteur des récepteurs muscariniques). Il n'est pas affecté par le BN 50730, un antagoniste du PAF. La réponse à l'endothéline est insensible et à la pirenzépine et au BN 50730. Ces résultats indiquent que les trois agonistes agissent par des récepteurs différents. Cependant, leurs effets ne sont pas additifs, ce qui suggère que leur récepteurs seraient portés par les mêmes cellules et seraient couplés à un même « pool » de  $PLc$ . La spécificité d'action de ces agonistes est confirmée par les résultats d'expériences de désensibilisation dans lesquelles la capacité des glomérules de répondre à chacun des trois agonistes est testée après qu'ils aient été stimulés une première fois par une forte dose de l'un d'entre eux. Dans ces conditions, le carbachol ne provoque aucune désensibilisation (réponse normale aux trois agonistes), contrairement au PAF et à l'endothéline. La désensibilisation induite par le PAF n'affecte que la réponse au PAF et celle induite par l'endothéline n'affecte que la réponse à l'endothéline ( $K_{1/2}$  apparent :  $5 \times 10^{-10}$  M pour le PAF, et  $10^{-8}$  M pour l'endothéline). De plus, la désensibilisation par le PAF, mais non celle par l'endothéline, est inhibée par la staurosporine et impliquerait donc l'activation d'une protéine kinase C.

En conclusion, la microméthode que nous avons mise au point permet d'étudier le métabolisme des  $PI_s$  sur une faible quantité de matériel biologique ; un seul glomérule correspondant à quelques centaines de cellules peut suffire. Nous espérons pouvoir adapter cette technique à des segments tubulaires obtenus par microdissection de façon à y étudier les mécanismes régulateurs qui empruntent la voie de la  $PLc$  et des  $IP_s$ .

## VII. CARACTÉRISATION DES CANAUX CALCIQUES PRÉSENTS DANS LE CANAL COLLECTEUR DU REIN DE RAT

(M. IMBERT-TEBOUL ET G. VASSENT)

Des expériences antérieures réalisées au laboratoire sur des fragments de canal collecteur cortical microdisséqués et superfusés ont montré que ce segment du néphron est le siège d'une perméabilité de repos élevée pour le calcium : La concentration intracellulaire de calcium ionisé,  $[Ca^{2+}]_i$ , mesurée à l'aide de Fura-2, variait, en effet, linéairement en fonction de la concentration

du calcium extracellulaire,  $[Ca]_e$ , suggérant que des canaux calciques ouverts sont présents dans les membranes plasmiques des cellules en l'absence de toute stimulation hormonale.

Localiser ces canaux restait, à l'évidence, le préalable indispensable à toute étude ultérieure visant à en rechercher la fonction. Nous avons donc, au cours de l'année 89-90, monté une installation permettant d'associer la technique de microperfusion tubulaire *in vitro* à celle de la microscopie de fluorescence pour mesurer la concentration des électrolytes intracellulaires. Cette approche est la seule qui permette, en effet, de modifier de manière indépendante la composition du milieu luminal et du milieu périlitubulaire et, ainsi, de caractériser les propriétés respectives de perméabilité des membranes apicale et basolatérale des cellules.

Le dispositif de fluorescence utilisé (MSP 21, Zeiss) nous a permis de mesurer  $[Ca^{2+}]_i$ , à l'aide de Fura-2, sur des fragments tubulaires uniques, en double excitation, à raison d'un couple de mesures toutes les 2 secondes. Un programme a été développé au laboratoire pour commander les différents éléments du système (filtres, obturateurs, etc.), contrôler en continu sur l'écran d'un micro-ordinateur l'évolution des signaux émis (500 nm) et en enregistrer le rapport sur le disque dur pour le calcul ultérieur de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Nos expériences ont été réalisées sur des canaux collecteurs médullaires isolés chez de jeunes rats (100-120 g) pour éviter l'hydrolyse du tissu interstitiel à la collagénase. Cette enzyme détruit, en effet, la lame basale de l'épithélium tubulaire, ce qui rend les tubules plus fragiles et impropres à la microperfusion. A cette réserve près, les milieux et conditions expérimentales de nos expériences ont été en tous points comparables à celles adoptées précédemment.

Nos résultats ont montré que des changements de  $[Ca]_e$  produisent des variations marquées de  $[Ca^{2+}]_i$  lorsqu'ils sont effectués du côté périlitubulaire mais restent sans effet lorsqu'ils sont effectués du côté luminal. En l'absence de calcium dans le milieu de perfusion (luminal), il existe bien (au moins entre 0 et 1 mM) une relation linéaire entre  $[Ca]_e$  dans le bain et  $[Ca^{2+}]_i$  ( $r = 0,99$ ). Ces résultats indiquent formellement que la perméabilité de repos du canal collecteur pour le calcium, démontrée antérieurement, est bien une propriété intrinsèque de ce segment et que les canaux calciques qui en rendent compte sont localisés dans la membrane basolatérale des cellules.

Nous avons pu confirmer, également, que ces canaux étaient indépendants du potentiel membranaire, insensibles à la plupart des bloquants généralement utilisés (verapamil, dihydropyridines, etc.), mais bloqués par le  $Ni^{2+}$  (5 mM) et dépendants du pH extracellulaire.

La question qui se pose, maintenant, est de savoir quelle fonction leur attribuer.

Nous nous proposons de rechercher 1) s'ils interviennent dans la régulation du volume cellulaire, 2) s'ils jouent un rôle dans les actions hormonales associées à une variation de  $[Ca^{2+}]_i$ .

## BIBLIOGRAPHIE

C. BAILLY, M. IMBERT-TEBOUL, N. ROINEL & C. AMIEL. *Isoproterenol increases Ca, Mg and NaCl reabsorption in mouse thick ascending limb*. Am. J. Physiol. 258 : F1224-1231, 1990.

F. MOREL & D. BUTLEN. *Hormonal receptors in the Isolated Tubule*. In : Methods in Enzymology, Vol. 191, Renal Hormonal Receptors, pp. 303-325, Academic Press, 1990.

J. MARCHETTI, S. TANIGUCHI, F. LEBRUN & F. MOREL. *Cholinergic agonists increase cell calcium in rat medullary collecting tubules. A fura-2 study*. Pflügers Arch. 416 : 561-567, 1990.

L. CHEVAL & A. DOUCET. *Measurement of Na-K-ATPase-mediated rubidium influx in single segments of rat nephron*. Am. J. Physiol. 259 : F111-F121, 1990.

B. SEMMEKROT, D. CHABARDES, S. ROSEAU, S. SIAUME-PEREZ & D. BUTLEN. *Developmental pattern of cyclic guanosine monophosphate production stimulated by atrial natriuretic peptide in glomeruli microdissected from kidneys of young rats*. Pflügers Arch. 416 : 519-525, 1990.

C. BARLET-BAS, L. CHEVAL, C. KHADOURI, S. MARSY & A. DOUCET. *Difference in the Na affinity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase along the rabbit nephron : modulation by K*. Am. J. Physiol. 259 : F246-F250, 1990.

D. CHABARDES, M. MONTEGUT, Y. ZHOU & S. SIAUME-PEREZ. *Two mechanisms of inhibition by prostaglandin E<sub>2</sub> of hormone-dependent cell cAMP in the rat collecting tubule*. Mol. Cell. Endocrinol. 73 : 111-121, 1990.

O. LEVILLAIN, A. HUS-CITHAREL, F. MOREL & L. BANKIR. *Localization of arginine synthesis along rat nephron*. Am. J. Physiol. 259 : F916-F923, 1990.

F. MOREL & J. MARCHETTI. *Sites et mécanismes d'action des hormones le long du néphron*. Ann. d'Endocrinol., 51, 112-118, 1990.

C. FAUTH, D. CHABARDES, M. ALLAZ, M. GARCIA, B. ROSSIER, F. ROCH-RAMEL, M. CLAIRE. *Establishment of renal cell lines derived from S<sub>2</sub> segments of the proximal tubule*. Renal Physiol. Biochem., 14 : 128-139, 1991.

A. AMMAR, A. SCHMIDT, B. SEMMEKROT, S. ROSEAU & D. BUTLEN. *Receptor for neurohypophysial hormones along the rat nephron : <sup>125</sup>I-labelled d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> [Tyr(Me)<sup>2</sup>, Thr<sup>4</sup>, Orn<sup>8</sup>, Tyr-NH<sub>2</sub><sup>9</sup>] vasotocin binding in microdissected tubules*. Pflügers Arch., 418 : 220-227, 1991.

G. EL MERNISSI, C. BARLET-BAS, C. KHADOURI, D. MARSY, L. CHEVAL & A. DOUCET. *Characterization and localization of ouabain-insensitive Na-dependent ATPase activities along the rat nephron*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1064 : 205-211, 1991.

W.G. GUDER & F. MOREL. *Biochemical characterization of individual nephron segments*. *Handbook of Renal Physiology*, edited by E. Windhager, sous presse.

F. MOREL. *Methods in kidney physiology (past, present and future)*, Prefatory chapter in : *Annual Review of Physiology*, sous presse.

F. MOREL & A. DOUCET. *Functional segmentation of the nephron*. *The Kidney : Physiology and Pathophysiology*, 2nd Edition, D.W. Seldin et G. Giebisch Ed., Chap. 31, sous presse.

#### EXPOSÉS, CONGRÈS, MISSIONS ET STAGES

F. MOREL a présenté un exposé à la Société Scientifique d'Hygiène Alimentaire, Paris, 7 nov. 1990.

A. DOUCET a participé au stage de formation des directeurs (CNRS), nov. 1990.

C. BARLET-BAS a présenté une communication au « Satellite Meeting of the XIth International Congress of Nephrology » sur « Endogenous digitalis-like factors », Giessen, FRG, juillet 1990.

J. MARCHETTI et G. DAGHER ont présenté chacun une communication orale au 23rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Whashington, 2-5 déc. 1990.

D. BUTLEN a donné une conférence sur invitation à la Katholieke Universiteit, Academisch Ziekenhuis Nijmegen (The Netherlands).

A. DOUCET a fait des exposés sur invitation à :

— International Congress of Nephrology, Tokyo, juillet 1990.

— Symposium « Proton, Bicarbonate & Chlorure Transport », Nara, juillet 1990.

— Département de Biologie du CEA, Saclay, janvier 1991.

— Département de Médecine, Université d'Ottawa, Canada, février 1991.

— Département de Physiologie, Université de Montréal, Canada, février 1991.

— Département de Chimie Biologie, Faculté de Médecine, Bicêtre, mars 1991.

- Comité d'Interface INSERM, Société de Néphrologie, Paris, mai 1991.
- Centre Hospitalier Régional Universitaire, Angers, mai 1991.

D. CHABARDES a fait un exposé à l'Institut de Physiologie et de Biochimie de l'Académie des Sciences d'URSS, Léninegrad, 1991.

G. DAGHER a présenté une communication orale au congrès de la FASEB, Atlanta, Etats-Unis, avril 1991.

A. HUS-CITHAREL a donné un séminaire à l'Hôpital Necker, Paris, 17 mai 1991.

#### ENSEIGNEMENT

DEA de Physiologie et de Physiopathologie Rénales, Université Paris VII :  
C. BARLET-BAS (4 heures), D. BUTLEN (4 heures), D. CHABARDES (4 heures), A. DOUCET (14 heures), F. MOREL (7 heures), R.M. RAJERISON (4 heures).

DEA d'Endocrinologie, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI :  
D. BUTLEN (4 heures), D. CHABARDES (3 heures), M. IMBERT-TEBOUL (4 heures).

DEA de Pharmacologie, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI :  
A. DOUCET (3 heures).

Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales, Faculté de Médecine :  
D. CHABARDES (2 heures).

Magistère de Biologie-Biochimie, Ecole Normale Supérieure, Paris VI :  
C. BARLET-BAS (12 heures).

Préparation à l'agrégation Externe (Sciences de la Vie), Université Pierre et Marie Curie, Paris VI :  
C. BARLET-BAS (23 heures).

Préparation au CAPES et à l'Agrégation internes (Sciences Naturelles), Université Pierre et Marie Curie, Paris VI :  
C. BARLET-BAS (8 heures)

#### THÈSE

B. SEMMEKROT a soutenu sa Thèse de Médecine à la Katholieke Universiteit, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, le 20 mars 1991.



GROUPE DE NEUROENDOCRINOLOGIE CELLULAIRE  
ET MOLÉCULAIRE - U.R.A. C.N.R.S. 1115  
Responsable : Madame A. TIXIER-VIDAL, Directeur de Recherche C.N.R.S.

RAPPORT D'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE  
Juin 1990 - Juin 1991

L'objectif général des recherches réside dans l'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 (GH3), 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*

A. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE PROCESSUS SÉCRÉTOIRE DE LA PROLACTINE

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

Les recherches se sont poursuivies sur les thèmes en cours de développement : régulation neuroendocrine de l'expression des oncogènes nucléaires des familles *fos* et *jun* dans les cellules GH3 — interaction de la Vitamine D3 avec le TRH et d'autres hormones contrôlant le niveau des ARNm PRL dans les cellules GH3. En outre, un nouveau thème a été abordé, ayant pour objectif de mettre en évidence les liens potentiels entre le niveau de méthylation du gène de la prolactine et les régulations exercées sur ce gène par des facteurs d'expression tissulaire spécifique tels que le facteur Pit/1 et/ou des hormones périphériques (œstrogènes, glucocorticoïdes, hormones thyroïdiennes). Les résultats publiés, sous forme de mémoires ou de résumés de congrès, concernent les points suivants.

*Mise en évidence d'une régulation hormonale du gène de la sécrétogranine I dans les lignées GH3*

(J.N. LAVERRIÈRE et coll., 1991)

La sécrétogranine I (SgI) appartient à une famille de protéines acides sulfatées spécifiques de la matrice des grains de sécrétion. Contrairement aux cellules à prolactine (PRL) et aux cellules à hormone de croissance (GH) de l'antéhypophyse normale, les lignées de la famille GH3 possèdent peu ou pas de grains de sécrétion, suivant les lignées. En outre, dans les lignées à PRL, le nombre de ceux-ci peut être régulé par des traitements hormonaux. Le niveau d'expression du gène SgI a donc été analysé par la mesure de l'accumulation de ses ARNm dans diverses lignées et conditions hormonales. Les ARNm SgI sont relativement abondants dans les cellules GH3B6 cultivées en condition de routine. La comparaison de leur niveau d'expression constitutive dans différentes lignées parentes montre une bonne corrélation avec celui des ARNm PRL. Le niveau des ARNm SgI fait l'objet d'une régulation hormonale qui est parallèle à celle observée pour les ARNm PRL dans le cas des hormones stéroïdes, et ceci aussi bien pour l'effet stimulant de l'œstradiol 17 $\beta$  que pour l'effet inhibiteur de la dexaméthasone. Par contre, le neuropeptide TRH exerce un effet inhibiteur sur les ARNm SgI, à l'inverse de son effet stimulant bien connu sur l'accumulation des ARNm PRL. Aucune corrélation n'est observée avec le niveau d'expression des ARNm GH, quel que soit leur niveau d'expression. Ces résultats suggèrent fortement une régulation indépendante des gènes des protéines composantes des grains de sécrétion.

*Interaction de la Vitamine D3 dans le contrôle hormonal de l'expression du gène PRL*

(J.L. RICHARD)

J.L. RICHARD a précédemment montré que le prétraitement par la Vitamine D3 (1.25.D3) potentialise l'effet stimulant du TRH sur l'expression du gène PRL dans la lignée GH3B6 et que cet effet se situe à un niveau postérieur à la liaison du TRH. Il a, cette année, précisé la cinétique de cet effet et tenté de définir le niveau post-récepteur mis en jeu. L'effet de la Vitamine D3 exige un traitement prolongé (48h) et est bloqué par la cycloheximide. Les mécanismes dépendants de la protéine kinase C (PKC) sont impliqués en partie, mais le taux de la PKC apprécié par liaison du <sup>3</sup>H-PDBu n'est pas modifié (Richard et al., 1991). L'influence de l'environnement hormonal sur cette interaction est à l'étude.

**B. MÉCANISMES CELLULAIRES - BIOLOGIE DU PROCESSUS SÉCRÉTOIRE**

C. TOUGARD (responsable), N. BRUNET DE CARVALHO, E. VILA PORCILE, A. MORIN, L. NASCIUTTI, S. VAN DE MOORTELE, E. ROSENBAUM, R. PICART

Les recherches se sont poursuivies sur les voies intracellulaires de migration et de tri des protéines exportées et sur les mouvements membranaires qui interviennent à différentes étapes du processus sécrétoire. Une approche de

mutagénèse dirigée a été entreprise, en vue d'identifier dans la molécule de prolactine les motifs impliqués dans son transport intracellulaire et son adressage. Les résultats publiés concernent les points suivants.

*Réorganisation du cytosquelette des cellules GH3 en réponse au TRH*  
(S. VAN DE MOORTELE)

On attribue aux éléments du cytosquelette un rôle coordinateur des événements membranaires impliqués dans le processus sécrétoire. S. VAN DE MOORTELE a identifié par immunofluorescence les composants majeurs du cytosquelette des cellules GH3B6 :  $\beta$ -tubuline, cytokératine et F-actine. Elle a suivi par immunofluorescence et microscopie confocale leurs remaniements en concomitance avec la stimulation rapide de la libération biphasique de prolactine en réponse au TRH. Le TRH induit des modifications rapides et transitoires d'abord de la distribution de la tubuline, qui se traduisent par la formation, après 2 min, de bourgeons fluorescents de la membrane plasmique, puis de l'actine qui, après 5 minutes, s'organise en faisceaux de fibres parallèles à la membrane plasmique. Ces modifications sont parallèles à celles de la distribution intracellulaire de PRL et concomitantes de la phase aiguë et précoce de libération. Par contre, la phase soutenue de la libération, jusqu'à 30 minutes, s'accompagne d'un retour à l'organisation normale du cytosquelette. Il n'a pas été possible d'établir un lien causal entre les modifications précoces du cytosquelette et les seconds messagers responsables des effets précoces du TRH sur la libération de prolactine (VAN DE MOORTELE et al., 1991). En outre, le taxol, qui stabilise les microtubules d'une part, et d'autre part, le nocodazole, qui dépolymérise les microtubules et désorganise l'appareil de Golgi, n'affectent pas la réponse prolactinique au TRH (VAN DE MOORTELE et al., 1990). Dans les cellules GH3B6, les microtubules ne semblent donc pas impliqués dans le phénomène d'exocytose, mais plutôt dans le maintien de la forme de la cellule, elle aussi remaniée par le TRH.

*Obtention et caractérisation d'anticorps polyclonaux dirigés contre la membrane des grains de sécrétion antéhypophysaires*  
(N. BRUNET DE CARVALHO, L. NASCIUTTI, C. TOUGARD)

En vue de disposer d'un outil immunologique spécifique de la membrane des grains de sécrétion, un immunosérum a été obtenu chez le lapin par immunisation avec une fraction purifiée de membranes de grains de sécrétion. Il a été caractérisé par des techniques d'immunofluorescence et d'immunocytochimie ultrastructurale et par des techniques de « SDS-PAGE » suivies d'immuno-réplique, après des étapes d'épuisement différentiel. L'immunosérum ainsi purifié reconnaît 2 polypeptides majoritaires (125 Kd et 45 Kd) et 2 minoritaires (240 Kd et 90 Kd) dans une fraction purifiée de membranes de grains de sécrétion d'antéhypophyse de rat. Au microscope électronique, l'immunosérum purifié reconnaît la membrane des grains de sécrétion des

cellules antéhypophysaires, ainsi que la membrane de larges structures de type endosomal, de quelques vésicules et de quelques saccules golgiens. La même distribution est également observée dans les cellules du pancréas endocrine et exocrine. Ainsi, les anticorps sélectionnés semblent reconnaître des déterminants antigéniques communs aux membranes des grains de sécrétion des cellules endocrines et exocrines, qui pourraient jouer un rôle particulier dans le processus sécrétoire et plus particulièrement dans l'exocytose des grains de sécrétion (BRUNET DE CARVALHO et al., 1990).

#### *Distribution des composants des membranes basales antéhypophysaires*

E. VILA-PORCILE a poursuivi l'étude de la distribution de différents composants des membranes basales, *in vivo* et *in vitro*, dans des cultures primaires d'antéhypophyses de rat, en collaboration avec M. VIGNY (Paris). Elle a ainsi pu montrer que, comme la laminine, l'entactine, l'héparan sulfate protéoglycan et le collagène de type IV sont des composants des lames basales antéhypophysaires, mais, contrairement à la laminine, ils ne sont pas détectés à l'intérieur des cellules glandulaires. Par contre, ces quatre composants sont détectés *in vitro* dans les fibroblastes et dans un réseau de matériel extracellulaire. Comme *in vivo*, seule la laminine est exprimée à l'intérieur des cellules endocrines et folliculo-stellaires. Ainsi, une coopération entre cellules endocrines pour la production de la laminine et cellules non endocrines pour la production des quatre constituants des membranes basales se met en place *in vitro* pour l'élaboration d'une nouvelle matrice extracellulaire dans les cultures primaires (VILA-PORCILE et al., 1990).

Sur le plan technologique, D. GROUSELLE a contribué à la mise au point, avec une équipe de la Section de Pharmacologie et d'Immunologie du Département de Biologie du CEN/Saclay, d'un dosage immunoenzymatique de la prolactine de rat. La sensibilité et la spécificité de ce dosage sont similaires à celles du radioimmunos dosage réalisé avec le même immunsérum produit au laboratoire. Il présente notamment l'avantage d'éviter les contraintes et les risques d'un radiomarquage de la prolactine, à condition de disposer de l'appareil de mesure automatique nécessaire (GROUSELLE et al., 1990).

## 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.

**A. DIVERSIFICATION DES LIGNÉES NEURONALES****(F. DE VITRY, J. HILLION, J. CATELON)**

En collaboration avec M. HAMON et J. THIBAUT, F. DE VITRY a poursuivi ses recherches sur le rôle des monoamines dans la diversification des lignées neuronales. La première phase des travaux avait permis de montrer le rôle morphogénétique de la sérotonine sur les cellules hypothalamiques de souris, mettant en jeu un mécanisme régulateur de type autocrine ou paracrine. Une étude analogue a été conduite pour la dopamine (DA) dans le cerveau de rat, sachant que ce transmetteur apparaît très précocement (E12-E13), à la fois dans le tronc cérébral et dans l'hypothalamus. Le traitement répétitif des cultures de cellules prélevées à des stades précoces, soit par la DA, soit par l'apomorphine, agoniste mixte D1/D2, augmente significativement le nombre de cellules immunopositives pour la tyrosine hydroxylase (TH), de même que l'activité de la DOPA decarboxylase (DDC). Les agonistes sélectifs D1 ou D2 sont sans effet. Ces réponses sont observées à la fois dans des cultures de tronc cérébral et d'hypothalamus. Cependant, la sensibilité aux traitements apparaît plus tôt dans le tronc cérébral (E14) que dans l'hypothalamus (E15). Par ailleurs, l'effet stimulant sur l'activité de la DDC précède dans le temps la stimulation de TH (DE VITRY et al., 1991). Ces résultats soulèvent en particulier deux questions : 1. les mécanismes de régulation des gènes TH et DDC sont-ils indépendants ? 2. la TH et la DDC sont-elles exprimées dans les mêmes cellules ? Ceci sera abordé au niveau de l'expression des ARNm correspondants, par hybridation *in situ*.

**B. DIFFÉRENCIATION TERMINALE : ÉTUDE DU TRAFIC VÉSICULAIRE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT NEURONAL****(A. TIXIER-VIDAL, Yasu KAGOTANI, A. BARRET, R. PICART)**

Les neurones hypothalamiques matures possèdent deux voies vésiculaires majeures régulées : les vésicules synaptiques (SV) considérées comme organites de stockage de neurotransmetteurs classiques et les vésicules à cœur dense de large diamètre (LDCV), organites de stockage des neuropeptides parfois associés à des neurotransmetteurs classiques. Ces deux types de vésicules s'accumulent dans les boutons synaptiques, mais leur origine respective au niveau des périkaryons et les mécanismes responsables de leur ségrégation sont encore mal connus. L'ontogénèse de ces deux voies a été étudiée dans des neurones, grâce à la disponibilité de sondes immunologiques dirigées contre des protéines spécifiques, soit de la membrane des vésicules synaptiques (Synaptophysine, collaboration avec B. WIEDENMANN, Berlin), soit de la matrice des vésicules à cœur dense (Sécrétogranine II, collaboration avec W. HUTTNER, Heidelberg).

On avait précédemment suivi l'ontogénèse de la distribution de la Synaptophysine jusqu'à la mise en place des synapses et montré l'origine transgolgienne des vésicules à synaptophysine (TIXIER-VIDAL et al., 1988). Par double marquage en immunofluorescence, on a constaté l'apparition simultanée des deux protéines au niveau des périkaryons, plusieurs jours avant l'apparition des synapses. Cependant, contrairement à la Synaptophysine, la Sécrotogranine II n'est exprimée que dans une sous-population de neurones et sa distribution n'est pas limitée à la zone périnucléaire Golgienne. En effet, les fines structures positives sont également observées près de la membrane plasmique et dans les cônes de croissance neuritiques. La migration des vésicules à synaptophysine dans les varicosités et boutons synaptiques intervient plus tard que celle de la Sécrotogranine II, puis l'intensité du signal Synaptophysine dépasse ensuite largement celui de la Sécrotogranine II. Cette dissociation spatiale et temporelle de l'ontogénèse de ces deux marqueurs suggère fortement l'indépendance de deux voies vésiculaires régulées neuronales (TIXIER-VIDAL et al., 1990). La même conclusion est atteinte par Y. KAGOTANI, qui a localisé ces deux protéines au microscope électronique, par double marquage immunocytochimique, dans des neurones matures en culture. En effet, les deux protéines sont ségréguées à leur sortie du compartiment Golgi trans et ne sont jamais colocalisées, ni dans les neurites, ni dans les boutons synaptiques (KAGOTANI et al., 1990).

Les mouvements vésiculaires qui accompagnent la synaptogénèse offrent un modèle de choix pour l'étude des mécanismes de la migration des vésicules post-golgiennes. A l'heure actuelle, on attribue un rôle majeur aux petites protéines de liaison du GTP dans la régulation du transport vésiculaire intracellulaire. En collaboration avec B. GOUD (Institut Pasteur), nous avons localisé et quantifié une de ces protéines, Rab6p, au cours de la synaptogénèse en culture. Rab6p est co-localisée avec la synaptophysine dès les tout premiers stades du développement neuronal, jusqu'à la mise en place des premières synapses. Ensuite, le signal Rab6p devient minoritaire par rapport à celui de la synaptophysine. Corrélativement, le contenu en Rab6p des cellules, qui, initialement, augmentait régulièrement, devient stationnaire. Cette association transitoire de Rab6p avec les vésicules à synaptophysine suggère qu'elle contrôlerait le transport vectoriel post-golgien de ces vésicules, lors de la mise en place des synapses (TIXIER-VIDAL et al., 1990).

Le mécanisme de recyclage des vésicules synaptiques consécutifs à l'exocytose est aussi un domaine controversé. Une des hypothèses en faveur attribue un rôle important à la clathrine dont les cycles d'assemblage et de désassemblage contrôlent l'endocytose dans de nombreuses cellules. En collaboration avec B. GOUD (Institut Pasteur), nous avons étudié la distribution subcellulaire de la clathrine dans des neurones matures soumis à des cycles brefs de dépolarisation et repolarisation chimiques qui s'accompagnent de déplétion, puis de restauration vésiculaire. Par dosage immunoenzymatique des formes

libres et assemblées de clathrine, on a constaté que dans les neurones en culture, la clathrine est majoritairement sous forme libre et que ce taux n'est affecté ni par la dépolarisation, ni par la repolarisation. Par immunocytochimie ultrastructurale, la clathrine est localisée d'une part dans les péricaryons, au niveau du Golgi trans, sur les membranes « tapissées » de puits et de vésicules et d'autre part, dans les boutons synaptiques, à la surface « non tapissée » des vésicules synaptiques. Ces résultats posent le problème de la signification fonctionnelle du compartiment libre de clathrine et remettent en question le rôle de la clathrine dans le recyclage des vésicules synaptiques (GOUD et al., 1991).

## PUBLICATIONS

GROUSELLE D., TIXIER-VIDAL A. and PRADELLES P. (1990). *Enzyme immunoassays for thyroliberin (TRH) and TRH-elongated peptides in mouse and rat hypothalamus (TRH) and TRH-elongated peptides in mouse and rat hypothalamus. (Neuropeptides, 17, 155-162).*

GOURDJI D. (1990). *Neuropeptides et régulations de certains protooncogènes dans les cellules antéhypophysaires en culture. (Ann. Endocrinol., 51, n° 3-4, 126-129).*

DUNTAS L., KECK F.S., GROUSELLE D., ROSENTHAL J., WOLF C. and PFEIFFER E.F. (1991). *Thyrotropin-releasing hormone : further extraction studies and analysis by fast protein liquid chromatography and radioimmunoassay. (J. Endocrinol. Invest., 14, 173-179).*

DUHAU L., GRASSI J., GROUSELLE D., ENJALBERT A. and GROGNET J.M. (1991). *An enzyme immunoassay for rat prolactin : application to the determination of plasma levels. (J. Immunoassay, 12 (2), 233-250).*

DE VITRY F., HILLION J., CATELON J., THIBAUT J., BENOLIEL J.J. and HAMON M. (1991). *Dopamine increases the expression of tyrosine hydroxylase and aromatic amino acid decarboxylase in primary cultures of fetal neurons. (Developm. Brain Res., 59, 123-131).*

VAN DE MOORTELE S., ROSENBAUM E., TIXIER-VIDAL A. and TOUGARD C. (1991). *Rapid and transient reorganization of cytoskeleton in GH3B6 cells during short-term exposure to thyroliberin. (J. of Cell Science, 99, 79-89).*

GOUD B., FAIVRE-BAUMAN A., PICART R. and TIXIER-VIDAL A. (1991). *Subcellular distribution of clathrin in cultured hypothalamic neurons. (Biology of the Cell, 72, n° 1/2, 83-92).*

TIXIER-VIDAL A. and FAIVRE-BAUMAN A. (1992). *Ontogeny of TRH biosynthesis and release in hypothalamic neurons. (Trends in Endocrinology, 3, n° 2).*

LAVERRIÈRE J.N., RICHARD J.L., MORIN A., BUISSON N., TIXIER-VIDAL A., HUTTNER W.B. and GOURDJI D. (1991). *Secretogranin I (chromogranin B) mRNA accumulation is hormonally regulated in GH3B6 rat pituitary tumor cells. (Mol. and Cell. Endocrinology, 80, 41-51).*

#### CONGRÈS

2nd International Congress of Neuroendocrinology, Bordeaux, 24-29 juin 1990. A. TIXIER-VIDAL, D. GOURDJI, F. DE VITRY, J. HILLION, D. GROUSSELLE, A. BARRET.

38th Meeting of the European Tissue Culture Society, Londres, 3-6 septembre 1990. D. GOURDJI.

Third European Congress on Cell Biology, Florence, 2-7 septembre 1990. A. TIXIER-VIDAL, C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE, N. BRUNET DE CARVALHO, S. VAN DE MOORTELE.

4th Meeting of the International Pituitary Pathology Club, Vaison-la-Romaine, 14-21 septembre 1990. E. VILA-PORCILE.

2<sup>e</sup> Réunion de la Société Française de Culture de Tissus et de Cellules, Paris, 28 septembre 1990. A. TIXIER-VIDAL, D. GOURDJI, F. DE VITRY, N. BRUNET DE CARVALHO, A. MORIN, E. VILA-PORCILE.

Second European Workshop on Endocytosis, Paris, 1<sup>er</sup>-5 octobre 1990. C. TOUGARD.

Cours EMBO « Methods in Cell Biology » EMBL, Heidelberg, 15-24 octobre 1990. N. BRUNET DE CARVALHO.

15<sup>e</sup> Conférence en Neurobiologie, Gif-sur-Yvette, novembre 1990. F. DE VITRY.

Journées d'Etude de la S.F.M.E. : Hybridation in situ. Méthodes pratiques, Paris, 31 janvier-2 février 1991. C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE.

7<sup>e</sup> Réunion du Groupe Peptide, Aussois, 18-22 mars 1991. D. GOURDJI.

Colloque conjoint de la Société Française de Microbiologie et de la Société Française de Biochimie Moléculaire « Conception, sélection, production et analyse des protéines de nouvelle génération ». Palaiseau, Ecole Polytechnique, 15-17 mai 1991. N. BRUNET DE CARVALHO, A. MORIN.

Journée Scientifique de l'Université Bordeaux II : Physiologie et Physiopathologie de l'Hypophyse. Bordeaux, 6 juin 1991. C. TOUGARD.



## CO-ORGANISATION DE RÉUNIONS SCIENTIFIQUES

2<sup>e</sup> Colloque de la Société Française de Culture de Tissus et de Cellules, Paris, 28 septembre 1990. D. GOURDJI.

7<sup>e</sup> Réunion du Groupe Peptide, Aussois, mars 1991. D. GOURDJI.

## SÉMINAIRES

Journées Scientifiques de l'Institut de Biologie du Collège de France, 25 octobre 1990. E. VILA-PORCILE.

Kremlin Bicêtre, INSERM U 33, Unité de Recherche sur les Communications Hormonales, 16 novembre 1990. C. TOUGARD.

« Séminaire du Jeudi » CNRS, Paris, 8 novembre 1990. J.N. LAVERRIÈRE.

## ENSEIGNEMENT

D. GOURDJI

— Certificat de Pharmacologie Endocrinienne, Faculté de Médecine Lariboisière-St Louis, Université de Paris VII, 7 et 14 mai 1991.

— Module de Neuroendocrinologie Cellulaire, Maîtrise de Neurobiologie Cellulaire, Université de Paris VI, Faculté des Sciences : 12 heures de cours de mars à mai 1991.

C. TOUGARD

— Atelier de Formation INSERM n° 31 : Techniques immunocytochimiques en microscopie photonique et électronique. Reims, 22-23 janvier 1991.

— Cours dans le cadre des certificats C2 et C'2 de Biologie Cellulaire et Moléculaire. Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales, Faculté de Médecine, Saint-Antoine, Paris VI, 10 janvier 1991.

— Séminaire méthodologique dans le cadre du DEA d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire, CHU Kremlin-Bicêtre, 18 avril 1991.

J.N. LAVERRIÈRE et A. MORIN

— Ecole d'automne de Biologie Moléculaire « Etude de l'expression de gènes eucaryotes », Gif-sur-Yvette, 17-22 septembre 1990, Laboratoire des Hormones Polypeptidiques, Gif-sur-Yvette, formation permanente du CNRS, Délégation Régionale Ile-de-France Sud.

A. TIXIER-VIDAL

— DEA de Physiologie de la Reproduction, Paris VI, décembre 1989.

— DEA d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire, CHU Kremlin Bicêtre, décembre 1989.

SOUTENANCE DE THÈSE

Thèse de Doctorat ès Sciences, Université Paris VI, 19 décembre 1990. J.N. LAVERRIÈRE.