

Université de Montréal

**Mécanismes de dépolarisation membranaire induite par la
somatocrinine et son second messenger l'AMPC, dans les cellules
somatotropes chez le rat.**

par

Catherine Bleicher

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biologiques

Septembre 1997

© Catherine Bleicher, 1997



5. 1998 11m³

QH
302
U54
1998
V.003

Université de Montréal

Mécanisme de dépolymérisation membranaire induite par la somatostatine et son second messager LAFIC dans les cellules somatotropes chez le rat.

Dr.

Dr.

Christian Bléthen

Département de sciences biologiques

Université de Montréal

Mécanisme de dépolymérisation membranaire induite par la somatostatine et son second messager LAFIC dans les cellules somatotropes chez le rat.



Bléthen, Christian

Université de Montréal

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Mécanismes de dépolarisation membranaire induite par la
somatocrinine et son second messenger l'AMPc, dans les cellules
somatotropes chez le rat.**

Présenté par:

Catherine Bleicher

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Thérèse Cabana:	président-rapporteur
Dr Benoît Lussier:	directeur de recherche
Dr Stéphane Molotchnikoff	membre du jury

Mémoire accepté le: 8 décembre 2997

Sommaire

La sécrétion des neurotransmetteurs ou des hormones a fait l'objet de nombreuses études durant les trente dernières années, principalement depuis le modèle de couplage stimulation-sécrétion établi par Douglas en 1968. Les cellules somatotropes de l'adénohypophyse sont responsables de la sécrétion de l'hormone de croissance (GH). L'importance de cette hormone dans la croissance et le maintien du métabolisme adulte chez les mammifères, et les nombreuses pathologies induites par une déficience de la sécrétion de GH, font de ces cellules un modèle d'étude idéal et pertinent pour la sécrétion.

La somatocrine (GH-RH) stimule l'exocytose de la GH par les cellules somatotropes. Cependant, le mode d'action de ce neuropeptide est encore méconnu. Tout comme la plupart des réponses cellulaires, la sécrétion induite par la GH-RH modifie temporairement les propriétés électriques membranaires. Il a été démontré que la GH-RH dépolarise les cellules somatotropes de façon soutenue. Cette dépolarisation reflète une diminution de la résistance membranaire correspondant à l'ouverture de canaux ioniques. Les études de Kato avaient suggéré que cette dépolarisation est imputable à l'activation directe d'une conductance de fuite sodique par l'AMPc. Le but de ce mémoire est de vérifier si l'effet dépolarisant de la GH-RH est effectivement médié par l'AMPc. Nous avons également entrepris une étude systématique de la modulation des principaux courants en potentiel imposé par des analogues

de l'AMPC et de la GH-RH afin de déterminer quelles sont les conductances impliquées dans la dépolarisation.

Cette étude a été réalisée sur des cellules somatotropes de rat Sprague-Dawley fraîchement dispersées, isolées et mise en culture. Les variations du potentiel membranaire lors de la stimulation par la GH-RH et par un analogue de l'AMPC ont été mesurées en condition normale (milieu extracellulaire physiologique). Nos résultats suggèrent que la dépolarisation membranaire induite par la GH-RH pourrait effectivement être médié par l'AMPC.

Parallèlement à cette première étude, les variations des courants ioniques induites par des analogues de l'AMPC et la GH-RH ont été mesurées en condition normale et en milieux sélectivement appauvris en certains ions et contenant des inhibiteurs de canaux ioniques ou de la protéine kinase AMPC-dépendante (PKA). Ceci a révélé un système de double régulation basé sur le système intracellulaire de l'AMPC. L'AMPC semble inhiber une conductance de fuite potassique et activer une conductance potassique voltage-dépendant. La PKA inhiberait une conductance calcium- et voltage-dépendante. Les effets de l'AMPC et de la PKA sur les courants voltage-dépendants sont opposés et la réponse cellulaire dépendrait du ratio AMPC/PKA intracellulaire. En effet, la sensibilité des conductances modulées par l'AMPC semble être plus importante que celle de la conductance modulée par la PKA. Parallèlement à ces événements, une protéine G ou un autre enzyme différent de la PKA activerait une conductance de fuite sodique insensible au calcium. L'activation de cette dernière pourrait être à l'origine de la dépolarisation membranaire telle que suggérée par le modèle de Kato. Cependant, les résultats présentés dans le cadre de ce mémoire suggèrent que ce modèle est incomplet. La dépolarisation membranaire résulterait de l'activation et de l'inactivation de plusieurs conductances ioniques de fuite et voltage-dépendantes. Ce système serait très sensible et permettrait un contrôle très rigoureux de la sécrétion de GH induite par la GH-RH.

Table des matières

Sommaire	i
Table des matières	iii
Liste des Tableaux	ix
Liste des Figures	x
Liste des sigles et abréviations	xiii
Dédicace	xvi
Chapitre 1 Introduction générale	1
Chapitre 2 Revue des connaissances	3
2.1 Localisation anatomique de l'hypophyse et de l'hypothalamus.....	3
2.2 L'hormone de croissance	6
2.3 La GH-RH.....	8
2.4 Le récepteur de la GH-RH	10
2.5 Le GH-RH utilise l'AMPc comme second messenger	11
2.5.1 La cascade de l'AMPc	11

2.5.2	La règle de Sutherland décrivant l'AMPC comme second messenger	12
2.6	Mode d'action de la GH-RH.....	15
2.6.1	La sécrétion de la GH dépend d'une augmentation intracellulaire d'AMPC et une entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire	16
2.6.2	L'augmentation intracellulaire de calcium dépend d'une dépolarisation membranaire	17
2.7	Inventaires des courants ioniques identifiés dans les cellules somatotropes et leur implication dans la régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance	18
2.7.1	Technique utilisée pour l'étude des canaux ioniques le patch-clamp.....	19
2.7.1.1	Configuration cellule entière	20
2.7.1.2	Configuration patch perforé	23
2.7.2	Inventaire des conductances ioniques dans les cellules somatotropes	24
2.7.2.1	Conductances sodiques	24
2.7.2.2	Conductances calciques	26
2.7.2.3	Conductances potassiques.....	27
2.8	Modèle récapitulatif du mode d'action de la GH-RH.....	31
2.9	Objectifs du projet	32

Chapitre 3 Matériel et méthodes	36
3.1 Préparation cellulaire	36
3.1.1 Prélèvement de l'adénohypophyse	36
3.1.2 Dispersion et purification des cellules somatotropes	37
3.1.2.1 La dispersion	37
3.1.2.2 La purification	42
3.2 Stimulation des cellules somatotropes	43
3.3 Electrophysiologie	44
3.3.1 Poste d'enregistrement.....	44
3.3.2 Acquisition des données.....	44
3.3.3 Fabrication des électrodes et pipettes d'éjection	45
3.3.3 Patch-clamp enregistrements en configurations cellule-entière classique et patch perforé.....	46
3.3.3.1 Cellule entière classique	46
3.3.3.2 Patch perforé	46
3.4 Protocoles d'enregistrement électrophysiologique.....	49
3.4.1 Etude des variations du potentiel membranaire	49
3.4.2 Etude des modulations des courants ioniques	49
3.4.2.1 Courbe courant-voltage en sauts de potentiel	49
3.4.2.2 Courbe courant-voltage en rampe de potentiel	49
3.5 Solutions d'enregistrement	50
3.5.1 Solutions intracellulaires	50
3.5.2 Solutions extracellulaires.....	52

3.5.2.1	Système d'éjection.....	52
3.5.2.2	Etude de la modulation des courants de fuite.....	53
3.5.2.2.1	Témoins.....	53
3.5.2.2.2	Modulation d'une conductance de fuite	53
3.5.2.3	Etude de la modulation des courants sortants	55
3.5.2.3.1	Témoins	55
3.5.2.3.2	Modulation d'une conductance sortante.....	56
3.6	Analyse des données	56
3.6.1	Correction pour la résistance de série.....	56
3.6.2	Statistiques	60
Chapitre 4 Résultats.....		62
4.1	Observations générales	62
4.2	La GH-RH et le cpt-AMPC dépolarisent les cellules somatotropes	64
4.3	Validation de l'utilisation des rampes de potentiel dans l'étude des courants.....	65
4.3.1	La relation I/V classique et par rampe de potentiel	65
4.3.2	Le potentiel de repos des cellules somatotropes	77
4.3.4	Validation de l'utilisation d'un système d'éjection par pression	77
4.4.	Effets du cpt-AMPC et de la GH-RH sur les courants ioniques totaux	80

4.4.1	Le courant de fuite.....	80
4.4.2	Le courant sortant	83
4.5	Identification des courants modulés par le cpt-AMPC et la GH-RH	83
4.5.1	Courant de fuite.....	86
4.5.1.1	Caractérisation du courant de fuite dans les cellules somatotropes	86
4.5.1.2	Courants de fuite modulés par le cpt-AMPC et la GH-RH	87
4.5.2	Le courant sortant.....	96
4.6	Implication de la PKA dans la dépolarisation membranaire	106
4.6.1	Modulation du courant de fuite par les analogues de l'AMPC et la GH-RH.....	107
4.6.2	Modulation du courant sortant par le cpt-AMPC et la GH-RH.....	111
4.7	Résumé des résultats.....	114
Chapitre 5 Discussion.....		116
5.1	L'effet dépolarisant de la GH-RH peut être médié par l'AMPC	116
5.2	La modulation de certains courants est à l'origine de la dépolarisation membranaire.....	117
5.2.1	Les courants de fuite (non voltage-dépendants).....	117
5.2.2	Les courants voltage-dépendants (sortants).....	122

5.3	Conclusions et critiques	127
	Bibliographie	132
	Remerciements	xvii

Liste des Tableaux

Tableau 1	Composition (mM) des solutions intracellulaires	51
Tableau 2	Composition (mM) des différents milieux extracellulaires	54
Tableau 3	Nombre total de cellules somatotropes de rat testées selon les différents protocoles utilisés	63

Liste des Figures

Figure 1	Représentation schématique de l'hypophyse mammalienne en vues sagittale et ventrale	4
Figure 2	Représentation schématique de la cascade intracellulaire de l'AMPc	13
Figure 3	Configurations cellule entière et patch perforé en patch clamp	21
Figure 4	Modèle récapitulatif de la libération de GH induite par la GH-RH	33
Figure 5	Tête de rat après décapitation	38
Figure 6	Hypophyse et adénohypophyse de rat <i>in situ</i>	40
Figure 7	Cellule somatotrope de rat en patch clamp	47
Figure 8	Circuit équivalent de la membrane en configuration cellule entière	57
Figure 9	Dépolarisation membranaire induite par une éjection de cpt-AMPc ou de GH-RH dans une cellule somatotrope active.....	66

Figure 10	Dépolarisation membranaire induite par une éjection de cpt-AMPC ou de GH-RH dans une cellule somatotrope silencieuse.....	68
Figure 11	Courants ioniques totaux enregistrés en patch perforé.....	71
Figure 12	Superposition des courbes I/V mesurées par sauts et par rampe de potentiel sur une même cellule en milieu normal	73
Figure 13	Modulation des courants totaux par le cpt-AMPC en cellule entière en sauts et en rampe de potentiel	75
Figure 14	Relation I/V avant et suivant une éjection de milieu HBSS $2Ca^{2+}$	78
Figure 15	Modulation du courant de fuite par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à -90 mV	81
Figure 16	Modulation du courant sortant par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à +15 mV.....	84
Figure 17	Modulation du courant de fuite par la GH-RH mesuré à -90 mV en présence de TEA.....	88
Figure 18	Modulation du courant de fuite par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à -90 mV en présence de $0Ca+TEA$	91
Figure 19	Modulation du courant de fuite par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à -90 mV en présence de $0Na+TEA$	94

Figure 20	Modulation du courant sortant par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à +15 mV en présence de TEA.....	98
Figure 21	Modulation du courant sortant par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à +15 mV en présence de 0Ca.....	101
Figure 22	Modulation du courant sortant par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à +15 mV en présence de 0Ca+TEA	104
Figure 23	Modulation du courant de fuite par des analogues de l'AMPC et la GH-RH mesuré à -90 mV en présence d'inhibiteurs de la PKA	109
Figure 24	Modulation du courant sortant par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à +15 mV en présence d'inhibiteurs de la PKA.....	112
Figure 25	Modèle proposé de la modulation des courants de fuite et des courants sortants par la GH-RH	130

Liste des abréviations

8-br-AMPC	8-bromo-AMPC
A.B.	Artère basilaire
AC	Adénylate cyclase
Ag	Argent
AMP	Adénosine monophosphate
AMPC	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
A.S.H	Artère supérieure hypophysaire
ATP	Adénosine triphosphate
Ch. opt.	Chiasma optique
C.I.	Carotide interne
CO₂	Dioxyde de carbone
Cm	Condensateur
Cs₂SO₄	Sulfate de césium
D	Aspartate
db-AMPC	dibutyryl-AMPC
DMEM	Milieu essentiel modifié Dubbelco
DMSO	N,N-Diméthyle sulfoxide
EGTA-K	Acide éthylène glycol-bis(beta-aminoéthyléther)-N,N,N',N'- tétraacétique potassium
EGTA-N_a	Acide éthylène glycol-bis(beta-aminoéthyléther)-N,N,N',N'- tétraacétique disodique
GH	Hormone de croissance
GH-IH	Somatostatine

GH-RH	Somatocrine
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
H89	N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5 isoquinolinesulfonamide
H.A.	Hypophyse antérieure
HBSS	Milieu de Hanks modifié
HEPES	Acide N-[2-Hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonique]
H.I.	Hypophyse intermédiaire
H.P.	Hypophyse postérieure
IBMX	3-isobutyl-1-méthylxanthine
I_A	Courant potassique de type A
ic	Courant traversant le condensateur (C _m) de la membrane
IGF-1	Insulin like growth factor-I
I_{IR}	Courant potassique rectifiant entrant
I_K	Courant potassique rectifiant sortant
I_{KCa}	Courant potassique calcium-dépendant
im	Courant traversant la résistance (R _s) de la membrane
ip	Courant de pipette
K_{ATP}	Courant potassique ATP-sensible
KCl	Chlorure de potassium
K₂SO₄	Sulfate de potassium
LBTI	Inhibiteur de la trypsine extrait des haricots de Lima
M	Corps mamillaires
M199	Milieu 199
MEM	Milieu minimum essentiel
MgCl₂	Chlorure de magnésium
mM	Millimolaire
mV	Millivolt
nA	Nanoampères

NaCl	Cholure de sodium
NaHCO₂	Bicarbonate de sodium
nM	Nanomolaire
pA	Picoampères
PKA	Protéine kinase AMPc-dépendante
PKI	Inhibiteur de la PKA
P.P.	Plexus primaire
Pv	Noyau paraventriculaire
Rp-AMPSc	Isomère Rp de l'adénosine 3',5'-phosphorothioate cyclique
R	Récepteur
Rc	Résistance de la cellule
Rs	Résistance de série
S	Noyau supraoptique
TEA	Tétraéthylammonium
TMA	Tétraméthylammonium
tpm	Tours par minute
TTX	Tétradotoxine
v	Volume
Vm	Potentiel de membrane
Vp	Potentiel dans la pipette d'enregistrement
Y	Tyronine

Note: Le terme seal a été utilisé dans le cadre de ce mémoire pour décrire le scellement de la pipette d'enregistrement sur la membrane cellulaire (cf. Chapitres 1 et 2). Il n'existe pas, actuellement, de traduction internationalement acceptée de ce terme technique.

Dédicace

Je dédie ce travail à Claude Stempfel décédé le 23 mars 1996, et à sa femme Elisabeth Pagel. Claude a toujours été à mes côtés et m'a toujours soutenue dans mes choix de carrière et de vie.

En souvenir de mon grand-père, Charles Dreschler, décédé le 22 mai 1997.

A feu mon grand-père, Maurice Bleicher.

A mes parents.

1 Introduction générale

L'hormone de croissance (GH) est synthétisée et sécrétée par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse. Sa sécrétion est régulée par deux neuropeptides hypothalamiques: la somatocrinine (GH-RH), hormone de libération de la GH et la somatostatine (GH-IH) hormone d'inhibition de la sécrétion de la GH (Frohman et Jansson, 1986).

L'importance de la GH dans le développement des mammifères et dans le maintien du métabolisme chez l'adulte a suscité de nombreuses études, notamment sur les mécanismes d'action de la GH-RH. Cette dernière se lie spécifiquement à un récepteur métabotrope, couplé à l'adénylate cyclase, présent sur la membrane des cellules somatotropes (Mayo *et al.*, 1995). La GH-RH induit une augmentation de la production d'adénosine-3',5'-monophosphate cyclique (AMPC; Wong *et al.*, 1995) ainsi qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Holl *et al.*, 1988a,b, 1989; Kato *et al.*, 1992; Lussier *et al.*, 1991a). Cette dernière provient principalement d'une entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire et est essentielle pour la sécrétion de GH (Lussier *et al.*, 1988). Elle est imputable à l'activation de canaux calciques voltage-dépendants (Holl *et al.*, 1988a; Kato et Suzuki, 1986; Kato *et al.*, 1992, Lussier *et al.*, 1991a). L'activation de ces canaux est déclenchée par une dépolarisation membranaire. Des études électrophysiologiques en patch-clamp ont montré que la GH-RH dépolarise la membrane de façon soutenue de quelques millivolts (Chen *et al.*, 1989), et que cette dépolarisation est suffisante pour ouvrir les canaux calciques. Il a été

démonstré que la GH-RH utilise l'AMPc comme second messenger (cf section 2.5.2). Notre principale préoccupation dans le cadre de ce mémoire était de déterminer comment l'AMPc dépolarise les cellules somatotropes. Une dépolarisation résulte d'un changement de la perméabilité de la membrane cellulaire à différentes espèces ioniques. Cette dernière peut être évaluée en mesurant les variations des courants ioniques en potentiel imposé (voltage-clamp). L'utilisation combinée de milieux modifiés (appauvris en certains ions) et d'antagonistes des canaux ioniques nous permet d'isoler certains courants et de mesurer leurs variations en présence de GH-RH ou d'AMPc.

Ce travail comprend quatre grandes parties. Dans le second chapitre, nous discuterons brièvement de la localisation anatomique de l'adénohypophyse, de la nature et des effets de la GH, de la GH-RH et de son récepteur. Nous nous attarderons sur l'importance de la cascade intracellulaire de l'AMPc et de son implication dans la réponse des cellules à la GH-RH. Nous présenterons un inventaire des conductances ioniques identifiées par différents auteurs dans les cellules somatotropes. Enfin, nous décrirons un modèle récapitulatif de la sécrétion de GH induite par la GH-RH. Dans le troisième chapitre, nous présenterons notre approche expérimentale. Le quatrième chapitre consiste essentiellement en la description des observations réalisées dans le cadre de cette étude. Ces dernières seront discutées et critiquées en fonction des connaissances acquises dans le dernier chapitre.

2 Revue des connaissances

2.1 Localisation anatomique de l'hypophyse et de l'hypothalamus

L'hypothalamus constitue le plancher du diencephale. L'hypophyse est une petite glande arrondie située dans la selle turcique de l'os sphénoïde. Elle comprend deux lobes principaux reliés à l'hypothalamus par la tige pituitaire: 1) l'adénohypophyse (*pars distalis*), fortement vascularisée, qui dérive de l'endoderme à partir de la poche de Rathke (Figure 1A). Ce lobe contient un grand nombre de cellules épithéliales glandulaires et forme la partie glandulaire de l'hypophyse (lieu de synthèse et de sécrétion des hormones hypophysaires); 2) la neurohypophyse (*pars nervosa*) qui dérive du plancher de l'hypothalamus à partir d'un diverticule. Ce lobe contient les terminaisons axonales de neurones dont les corps cellulaires sont situés dans l'hypothalamus (Dollander et Fenart, 1979). Un troisième lobe, très peu vascularisé, est appelé lobe intermédiaire (*pars intermedialis*) car il est situé entre les *pars distalis* et *nervosa*.

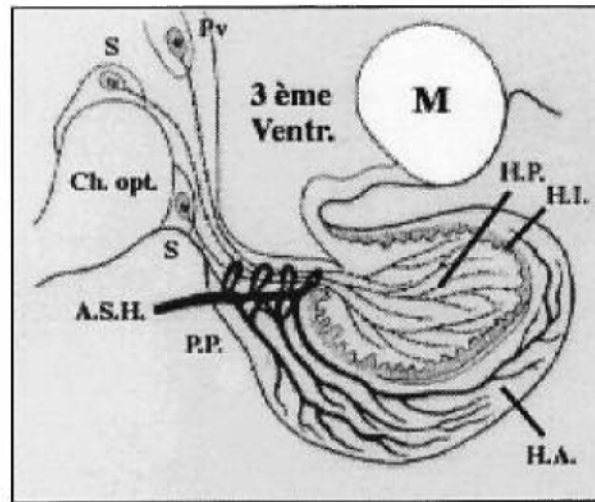
La voie tubéroinfundibulaire ou tubérohypophysaire prend origine dans la région tubérale de l'hypothalamus, plus particulièrement dans le noyau arqué. Ces fibres transportent les hormones hypophysiotropes vers les vaisseaux du système porte hypophysaire (Carpenter, 1991).

Deux jeux d'artères parviennent à l'hypophyse à partir de l'artère carotidienne interne (Figure 1B). Ces deux artères sont innervées par des neurones sympathiques post-ganglionnaires. L'artère hypophysaire supérieure forme un

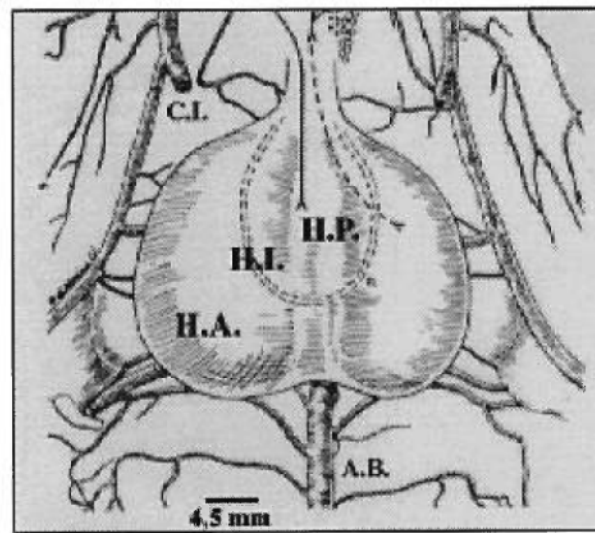
Figure 1: Représentation schématique de l'hypophyse mammalienne

- A** Vue sagittale de l'hypophyse. A.S.H.: Artère supérieure hypophysaire; Ch. opt.: Chiasma optique; H.P.: hypophyse postérieure ou pars nervosa; H.I.: lobe intermédiaire ou pars indermedialis; H.A.: adénohypophyse ou pars distalis; M: Corps mamillaires; P.P.: Plexus primaire; Pv: Noyau paraventriculaire; S: Noyau supraoptique. (Adapté de W.F. Ganong).
- B** Vue ventrale de l'hypophyse. Les lobes postérieur et intermédiaire sont vus par transparence et sont délimités par les pointillés. A.B.: Artère basilaire; C.I.: Carotide interne; H.P.: hypophyse postérieure ou pars nervosa; H.I.: lobe intermédiaire ou pars indermedialis; H.A.: adénohypophyse ou pars distalis. (Adapté de L.W. Swanson et E.T. Cunningham Jr.).

A



B



anneau autour de la partie supérieure de l'hypophyse; l'artère hypophysaire inférieure forme un anneau autour du lobe postérieur et rejoint l'infundibulum. Chacune de ces artères pénètre la tige pituitaire, se divise en sinusoïdes et pourvoient à l'apport sanguin du lobe antérieur. Ce sont ces derniers qui, par ailleurs, forment le système porte hypophysaire (Carpenter, 1991).

2.2 L'hormone de croissance

L'hormone de croissance (GH), également appelée somatotrophine est une hormone polypeptidique (191 acides aminés) synthétisée et sécrétée par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse sous un étroit contrôle hypothalamique. Ces cellules constituent environ 55% de la masse cellulaire totale de l'hypophyse antérieure (Surks et DeFesi., 1977). Des études immunocytochimiques réalisées sur des cellules hypophysaires dispersées de rats Sprague-Dawley ont montré que la proportion moyenne de cellules somatotropes est de 45% (Lussier, résultats non publiés). Elles sont principalement réparties dans les régions latérales du lobe adénohypophysaire.

Les cellules somatotropes sont des cellules excitables qui génèrent des trains de potentiels d'action de façon spontanée ou lors d'une stimulation par la GH-RH (Chen et al., 1989; Sims *et al.*, 1991). Ces derniers sont tout-ou-rien, calcium-dépendants et imputables à l'activation des canaux calciques de types L et T (cf. ci-dessus) (Chen et al., 1989, Chen et al., 1990c). La valeur maximale des potentiels d'action est de l'ordre de -20 mV (Sims *et al.*, 1991) et leur durée est de l'ordre de 800 à 900 msec. (Lussier, observations non publiées). Leur insensibilité à un antagoniste des canaux sodiques voltage-dépendants (TTX, cf. ci-dessous), semble exclure la participation d'une conductance sodique voltage-dépendante (Chen et al., 1989). De plus, il est fort probable que l'activation d'une conductance calcique de type T soit à l'origine de l'initiation des potentiels d'action (DeRiemer et Sakmann, 1986).

La GH se distingue des autres hormones hypophysaires en ce qu'elle n'agit pas sur une glande-cible mais sur une multitude de tissus-cibles. Elle agit sur certaines cellules du tractus digestif, du foie et du pancréas, qui répondent à cette stimulation par la synthèse et la sécrétion d'un polypeptide de faible poids moléculaire, la somatomédine C (IGF-1: insulin like growth factor-I), qui sera transportée dans le sang liée à une protéine de haut poids moléculaire (dont la synthèse dépend de l'hormone de croissance). Le taux de somatomédine C circulante est généralement proche du taux de sécrétion de la GH. La GH est rapidement dégradée par le métabolisme; cependant, son action se manifeste durant une semaine. En effet, alors que la GH est rapidement inactivée par les protéases sériques, la somatomédine C est fortement liée à la protéine vectrice, constituant ainsi une réserve plasmatique. La GH est notamment responsable du développement de la plupart des tissus corporels, en favorisant la croissance et la division cellulaire, ainsi que de la différenciation de certains types cellulaires particuliers tels que les chondrocytes et les cellules musculaires (Strobl et Thomas, 1994).

Deux neuropeptides hypothalamiques régulent la sécrétion de la GH: la GH-RH et la GH-IH (Arimura et Culler, 1985; Brazeau *et al.*, 1973; Frohman et Jansson, 1986). La GH-RH exerce une action stimulatrice sur la sécrétion de l'hormone de croissance alors que la GH-IH l'inhibe. La sécrétion de la GH est pulsatile. Elle dépend de l'interaction entre la GH-RH et la GH-IH au niveau de la cellule somatotrope. Tannenbaum et Ling (1984) ont décrit un modèle de sécrétion pulsatile asynchrone au sein duquel les pulses de GH résultent de baisses de libération de GH-IH et de pulses de libération de GH-RH. Les diminutions de sécrétion de GH correspondent à une forte libération de GH-IH et une faible libération de GH-RH. Les mesures des taux de GH-RH et GH-IH dans le système porte hypophysaire de Plotsky et Vale (1985) supportent ce modèle. De nombreuses études se sont attachées à la compréhension des mécanismes responsables de la libération de la GH, notamment en réponse à la GH-RH.

2.3 La GH-RH

Bien que la GH-RH ne fut isolée qu'en 1982, son existence avait été suggérée par les travaux de Reichlin en 1960 (Frohman et Jansson, 1986), qui avait démontré qu'une lésion bilatérale de l'hypothalamus ventromédian chez le rat résultait en une absence de croissance linéaire. Une activité stimulatrice de la sécrétion de la GH avait, par ailleurs, été observée dans des extraits hypothalamiques (Deuben et Meites, 1964). Frohman *et al.* ont démontré en 1968 (Frohman et Jansson, 1986), qu'une lésion électrolytique de l'hypothalamus ventromédian chez le rat diminuait les taux de GH hypophysaire et sérique. L'année suivante, ils rapportaient une augmentation des taux de GH sérique en réponse à une stimulation des noyaux ventromédian et arqué hypothalamiques. Ce même laboratoire montra, en 1971, qu'une administration intrapituitaire d'extraits hypothalamiques ovins chez le rat produisait une augmentation importante des taux de GH circulants. De nombreux laboratoires ont tenté d'isoler la GH-RH à partir de préparations hypothalamiques, mais cela résultait le plus souvent en une perte de l'activité biologique durant la purification (Frohman et Jansson, 1986). La très faible concentration de GH-RH dans les extraits hypothalamiques représentait un obstacle supplémentaire.

A partir des années 60, quelques observations cliniques (Frohman et Jansson, 1986) ont suggéré un lien entre les tumeurs carcinoïdes et l'acromégalie (pathologie induite par une hypersécrétion de GH chez l'adulte). En 1976, Sonksen *et al.*, ont décrit une diminution de l'hypersécrétion de GH après l'ablation d'une tumeur carcinoïde bronchique chez deux patients souffrant d'acromégalie. Cela semblait indiquer que la tumeur avait un effet stimulateur sur la sécrétion de GH. A la fin des années 70 deux groupes ont observé une sécrétion de GH par des cellules hypophysaires en culture après l'ajout d'extraits de deux tumeurs carcinoïdes bronchiques (Frohman et Jansson, 1986).

Au début des années 80, les équipes de Thorner (Thorner *et al.*, 1982) et de Sassolas (Sassolas *et al.*, 1983), ont identifié deux patients souffrant d'adénomes pancréatiques à Charlottesville en Virginie (États-Unis) et à Lyon (France). Les tissus prélevés ont été analysés par les laboratoires de Vale (Rivier *et al.*, 1982) (tumeur de Charlottesville) et de Guillemin (Guillemin *et al.*, 1982) (tumeur de Lyon). Les deux laboratoires annoncèrent durant l'automne 1982 le séquençage de la GH-RH. La GH-RH est un peptide de faible poids moléculaire existant sous trois formes: 1-44-NH₂, 1-40-OH, et 1-37-NH₂, la seconde forme étant la plus répandue (Arimura et Cutter, 1985). Spiess *et al.* (1983), ont isolé la GH-RH à partir de fragments hypothalamiques humains fournis par Reichlin. Deux formes étaient présentes: 1-44-NH₂ et 1-40-OH. Différentes études ont alors démontré que la GH-RH est un stimulateur puissant de la sécrétion de la GH *in vitro* et *in vivo* à des doses physiologiques proches des autres facteurs de sécrétion connus (Arimura et Cutter, 1985). La GH-RH est spécifique pour la sécrétion de la GH, tant *in vitro* qu'*in vivo*, chez les animaux de laboratoire et chez l'homme.

Il a été démontré par des études immunocytochimiques et d'hybridation *in situ* que la synthèse et la libération de GH-RH provient majoritairement des cellules neurosécrétrices du noyau arqué hypothalamique; ces cellules expriment l'ARN messager (Mayo *et al.*, 1995). Toutefois, des cellules neurosécrétrices de la GH-RH ont été identifiées dans les extrémités dorsale et ventrale du noyau ventromédian hypothalamique et dans l'hypothalamus latéral. On retrouve des corps cellulaires, selon l'axe rostrocaudal, du chiasma optique aux corps mamillaires. Les fibres nerveuses des cellules neurosécrétrices des noyaux ventromédian et arqué hypothalamiques projettent leur axone vers l'éminence médiane puis vers les capillaires du plexus primaire du système porte hypophysaire (Frohmann et Jansson, 1986).

La GH-RH stimule non seulement la sécrétion de la GH, mais également la transcription du gène et la biosynthèse de la GH, la prolifération des cellules

somatotropes (Frohman *et al.*, 1992) et l'expression de son propre récepteur (Horikawa *et al.*, 1996).

2.4 Le récepteur de la GH-RH

Une activité de liaison spécifique à haute affinité pour différents analogues de la GH-RH a été mise en évidence dans des préparations de membranes hypophysaires de rat (Seifert *et al.*, 1985a,b) et de bovins (Velicelebi *et al.*, 1985). L'adénylate cyclase (AC) est l'enzyme responsable de la transformation de l'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc. L'activation de l'AC par la GH-RH est GTP-dépendante (Labrie *et al.*, 1983; Narayanan *et al.*, 1989; Spada *et al.*, 1984). En effet, il a été démontré que des analogues non hydrolysables du GTP ou de fortes concentrations de GTP diminue l'affinité de liaison du récepteur (Struthers *et al.*, 1989) et augmente l'activation de l'AC par la GH-RH (Spada *et al.*, 1984). Ces observations semblent indiquer qu'une protéine G de type G_s est impliquée dans la transduction du signal induit par la liaison de la GH-RH sur son récepteur. Ceci serait confirmé par le fait que la toxine de Choléra, qui prolonge l'activation de la protéine G_s en réduisant l'activité GTPasique de la sous-unité G_{α_s} de la protéine G_s (cf. ci-dessous) induit une augmentation dose-dépendante de la sécrétion de GH (Frohman *et al.*, 1992).

Le récepteur de la GH-RH a été cloné en 1992, tant chez l'humain (Mayo, 1992) que chez les rongeurs (Lin *et al.*, 1992, Mayo *et al.*, 1995). Les différents récepteurs ainsi clonés présentent la plupart des caractéristiques propres aux récepteurs couplés à la protéine G_s , e.g. récepteur β -adrénergique, (Mayo *et al.*, 1995): 7 domaines hydrophobes ayant le potentiel de former des hélices- α transmembranaires; des résidus cystéines dans la seconde et la troisième boucles extracellulaires qui formeraient un pont disulfure; un résidu cystéine dans la queue cytoplasmique pouvant être palmitoylé; un site amino-terminal pour la glycosylation; des sites potentiels de phosphorylation dans la troisième boucle

cytoplasmique; de nombreux résidus hautement conservés dans les domaines transmembranaires; un domaine amino-terminal comprenant 6 résidus cystéines conservés; selon les informations recueillies à partir des autres récepteurs, il semble que ce domaine serait extracellulaire et serait impliqué dans la liaison du ligand. Le récepteur GH-RH ne possède cependant pas le motif DRY (D: Aspartate; R: Arginine; Y: Tyrosine) au début de la seconde boucle cytoplasmique qui est pourtant retrouvée sur de nombreux récepteurs. Le motif DRY est essentiel pour l'efficacité de certains récepteurs tels que le récepteur de la gonadotropine (interaction avec la protéine G) (Arora *et al.*, 1995) et le récepteur α -B1-adrénergique (transition entre les états actif et inactif) (Scheer *et al.*, 1996).

Ces observations suggèrent que les effets de la GH-RH sont médiés par l'activation d'un récepteur membranaire spécifique couplé à une protéine G de type G_s et à l'adénylate cyclase.

2.5 La GH-RH utilise l'AMPc comme second messenger

De nombreuses études depuis 1967, semblent confirmer que la GH-RH utilise l'AMPc comme second messenger. Les premières données ont été obtenues 15 ans avant l'isolation de la GH-RH. En effet, on avait observé qu'une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc (source exogène ou inhibition de la dégradation de l'AMPc présent) résultait en une augmentation de la sécrétion de la GH (Frohman *et al.*, 1992).

2.5.1 La cascade de l'AMPc

La cascade de l'AMPc est activée lors de la liaison d'un ligand sur un récepteur couplé à la protéine G_s (Hammond et Tritsch, 1991). Les protéines G_s sont constituées de trois sous-unités protéiques (hétérodimères) nommées α_s , β et γ . Lorsque la G_s est inactive, la sous unité α_s lie le GDP (Hammond et Tritsch, 1991). Lors de l'activation du récepteur, la protéine G_s vient se lier sur une région

intracellulaire de ce dernier. Le GTP déplace le GDP sur la sous-unité α_s . Cela induit la dissociation du complexe $\beta\gamma$ du complexe α_s -GTP. La sous-unité α_s -GTP se lie à un domaine intracellulaire de l'adénylate cyclase (AC), ce qui résulte en l'activation de cet enzyme (Hammond et Tritsch, 1991). La sous-unité α_s -GTP possède une activité GTPasique. L'hydrolyse du GTP en GDP et en résidu phosphate Pi conduit à la dissociation de la sous-unité α_s et de l'AC, et à sa ré-association avec le complexe $\beta\gamma$ (Hammond et Tritsch, 1991). L'AC catalyse l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc et en résidus phosphate P_{PPi}. L'AMPc peut activer la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) (Hammond et Tritsch, 1991). La PKA est un tétramère constitué de deux sous-unités régulatrices et de deux sous-unités catalytiques. C'est la sous-unité régulatrice qui lie l'AMPc (Figure 2). La dégradation de l'AMPc en AMP est effectuée par la phosphodiesterase (Hammond et Tritsch, 1991).

2.5.2 La règle de Sutherland décrivant l'AMPc comme second messenger

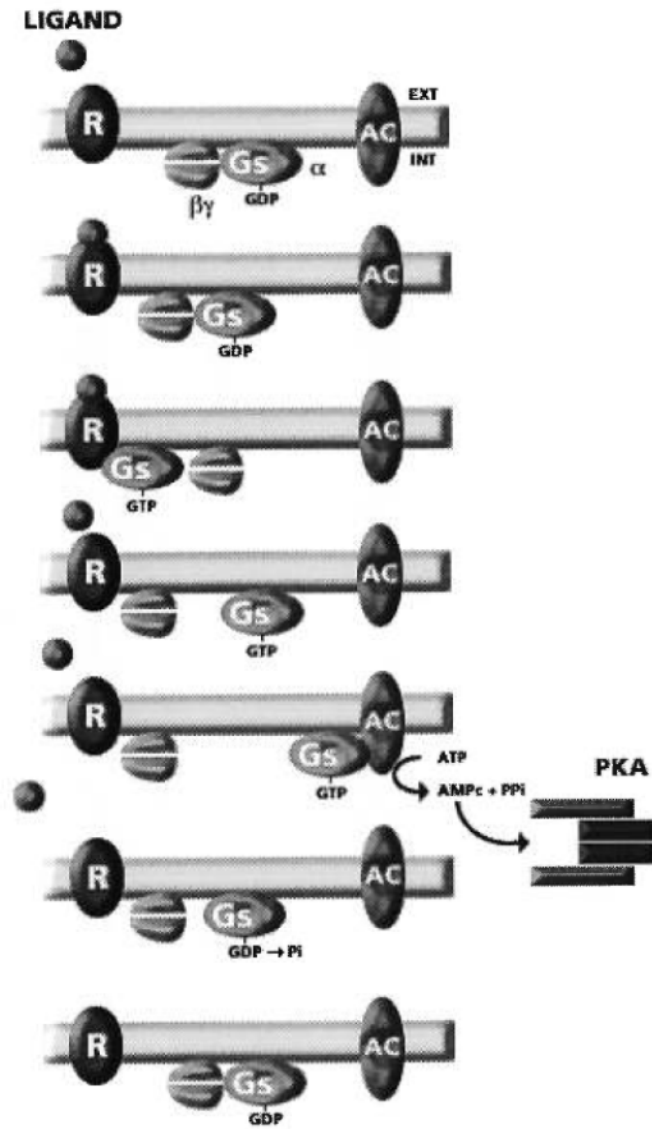
Sutherland a établi, en 1971 (Robinson *et al.*, 1971), quatre critères auxquels doit répondre une hormone pour démontrer que les effets de cette dernière sont médiés par l'activation de l'adénylate cyclase. Cette règle est toujours admise, et la GH-RH répond à ces critères:

1) *L'hormone doit être capable de stimuler l'adénylate cyclase*: Brazeau *et al.*, (1982); Labrie *et al.* (1983) et Reyl-Desmars *et al.* (1985) ont démontré que la GH-RH stimule l'adénylate cyclase dans les cellules hypophysaires. Narayanan *et al.*, (1989) l'ont démontré dans des cellules somatotropes purifiées chez le rat.

2) *L'hormone doit être capable de stimuler la production intracellulaire d'AMPc dans les cellules intactes; il doit être démontré que ces effets surviennent à des doses physiologiques*: Bilezikjian et Vale (1983) l'ont montré dans des préparations cellulaires hypophysaires. Sheppard *et al.* (1985) et Wong *et al.*,

Figure 2: Cascade intracellulaire de l'AMPc

Lors de sa liaison avec son récepteur (R), le ligand (GH-RH) active une cascade de réactions intracellulaires qui mène à l'activation de l'adénylate cyclase (AC) et de la protéine kinase A (PKA). (Adapté de Kandel *et al*, 1991).



(1995) ont démontré que la GH-RH (à des doses physiologiques) stimule la production d'AMPc dans les cellules somatotropes, et que cet événement précède la sécrétion de la GH.

3) *Il doit être possible de potentialiser l'action de l'hormone (augmenter l'amplitude de la réponse) en administrant simultanément l'hormone et un inhibiteur de la phosphodiesterase*: Brazeau *et al.* (1982); et Sheppard *et al.* (1985) ont démontré que la sécrétion de GH induite par la GH-RH est potentialisée par la présence de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) dans les cellules somatotropes. L'IBMX est un inhibiteur de la phosphodiesterase: l'AMPc n'est donc plus dégradé et son effet est prolongé.

4) *Il doit être possible de reproduire les effets physiologiques de l'hormone en ajoutant de l'AMPc exogène*: Brazeau *et al.* (1982); Naumov *et al.* (1994) et Sheppard *et al.* (1980) ont démontré que des analogues exogènes de l'AMPc induisent une sécrétion de GH comparable à celle déclenchée par la GH-RH.

De surcroît, Wong *et al.* (1995) et Sartin *et al.* (1996) ont récemment démontré que la PKA est directement impliquée dans la réponse des cellules somatotropes au GH-RH. En effet, la sécrétion de GH induite par la GH-RH est inhibée en présence d'inhibiteurs de la PKA (H89 ou Rp-AMPSc).

Ces résultats semblent confirmer que l'AMPc est l'un des seconds messagers impliqués dans la sécrétion de la GH induite par la GH-RH.

2.6 Mode d'action de la GH-RH

Le récepteur de la GH-RH est couplé à la cascade de l'AMPc et l'augmentation de la production d'AMPc intracellulaire est essentielle à la libération de la GH par les cellules somatotropes (Brazeau *et al.*, 1982; Naumov *et al.*, 1994

et Sheppard *et al.*, 1980). Cependant le rôle exact de l'AMPc au sein des mécanismes gouvernant l'exocytose de la GH demeure une inconnue.

2.6.1 La sécrétion de GH dépend d'une augmentation de la production intracellulaire d'AMPc et d'une entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire

La sécrétion d'une hormone requiert une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium cytosolique $[Ca^{2+}]_i$, telle que décrit dans le modèle de couplage stimulation-sécrétion de Douglas (1968). Brazeau *et al.* (1982) et Lussier *et al.* (1988), avaient observé que le calcium extracellulaire est nécessaire à la sécrétion de la GH induite par la GH-RH. Des études subséquentes ont montré que la GH-RH augmente de façon transitoire et rapide la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules somatotropes (Holl *et al.*, 1988a,b, 1989; Kato *et al.*, 1992; Lussier *et al.*, 1991a). Cette augmentation peut être, de surcroît, reproduite par des analogues exogènes de l'AMPc, tels que le dibutyryl-AMPc (db-AMPc), le 8-bromo-AMPc (8-br-AMPc) et le chlorophénylthio-AMPc (cpt-AMPc; Lussier *et al.*, 1991b), ou par l'activation de l'adénylate cyclase par la forskoline (Holl *et al.*, 1989). Elle serait due à une entrée d'ions calciques à partir du milieu extracellulaire car elle disparaît en milieu sans calcium (Holl *et al.*, 1988a; Kato et Suzuki, 1986; Lussier *et al.*, 1991a). Elle serait imputable à l'activation de canaux calciques voltage-dépendants (de type L) car elle est inhibée en présence d'antagonistes de canaux calciques tels que le cobalt (Holl *et al.*, 1988a; Kato *et al.*, 1992), la vérapamile (Holl *et al.*, 1988a; Kato et Suzuki, 1986) la nifedipine et le diltiazem (Lussier *et al.*, 1991a). Les canaux calciques de type L acquièrent leur sensibilité au voltage par une phosphorylation par la PKA (Kameyama, 1986). Un site potentiel de phosphorylation par la PKA α , en effet, été identifié sur deux sous-unités de ces canaux (Murphy et Tuana, 1989). L'activation de ces courants survient à un potentiel de -40 mV (Sims *et al.*, 1991). Le potentiel de repos des cellules somatotropes oscille entre -60 et -20 mV (Kato, 1996; Naumov *et al.*, 1994). De

fait, l'activation de ces canaux requiert, outre une phosphorylation par la PKA, une dépolarisation membranaire de l'ordre d'une dizaine de millivolts (mV).

2.6.2 L'augmentation intracellulaire de calcium dépend d'une dépolarisation membranaire

La sécrétion de GH peut être induite expérimentalement en dépolarisant la membrane (Israël *et al.*, 1983; Kraicer et Chow, 1982; Kraicer et Spence, 1981). La GH-RH dépolarise de quelques mV la membrane des cellules somatotropes de façon rapide et soutenue (Chen *et al.*, 1989). Une dépolarisation résulte d'un changement de la perméabilité de la membrane à différentes espèces ioniques. Il a été démontré que la dépolarisation induite par la GH-RH est concomitante avec une diminution de la résistance membranaire (Chen *et al.*, 1989), ce qui semble suggérer une modulation des conductances ioniques (ouverture de canaux ioniques). Quatre événements peuvent être à l'origine de cette dépolarisation: 1) l'activation d'une conductance sodique; 2) l'activation d'une conductance calcique; 3) l'activation d'une conductance de fuite moins spécifique; ou 4) l'inhibition partielle d'une conductance potassique sortante. Cette dépolarisation a été observée tant dans les cellules silencieuses (absence de potentiels d'action) que dans les cellules actives (présentant spontanément des potentiels d'action) et, elle est essentielle pour la sécrétion de la GH (Chen *et al.*, 1989).

Les canaux ioniques possèdent une structure tridimensionnelle qui délimite un pore aqueux au travers duquel passent sélectivement certains ions. Ils existent sous deux états: un état fermé (F) s'opposant au passage ionique; un état ouvert (O) permettant le passage des ions au travers du pore. Leur ouverture est étroitement régulée soit par un changement de potentiel membranaire (pour les canaux sensibles au voltage) soit par la fixation d'un ligand ou une phosphorylation par une protéine kinase. Certains canaux peuvent exister sous un troisième état dit d'inactivation (I). Cet état diffère de l'état fermé, car en dépit d'une dépolarisation prolongée, les canaux ne se réouvrent pas (Hammond et Tritsch, 1991).

2.7 Inventaires des conductances ioniques identifiés dans les cellules somatotropes et leur implication dans la régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance

L'électrophysiologie regroupe un certain nombre de techniques basées sur la détection des événements électriques au sein des organismes vivants. L'une d'entre elles permet de mesurer et d'enregistrer l'activité électrique d'une cellule ou d'un seul canal ionique: le patch clamp.

Les canaux ioniques, lorsqu'ils sont fermés, opposent une résistance au passage des ions. La résistance peut être évaluée selon la loi d'Ohm. Cette dernière peut être exprimée de deux façons:

- 1) $V = R.I$
- 2) $I = g.V$ avec $g = R^{-1}$

(où V représente le potentiel membranaire; R , la résistance membranaire; I , le courant total traversant la membrane; et g , la conductance membranaire). Lorsque les canaux s'ouvrent, la résistance diminue donc la conductance augmente. Les changements de conductance reflètent donc les changements de la perméabilité de la membrane aux ions. Dans les conditions de potentiel imposé (cf. ci-dessous), le potentiel est une constante, puisque sa valeur est maintenue expérimentalement à une valeur fixe. Les variations de conductance peut, ainsi, être évaluées par la mesure des variations des courants traversant la membrane cellulaire.

La classification des canaux ioniques peut être effectuée selon deux approches en potentiel imposé (cf. ci-dessous): la première consiste en la substitution des ions par des molécules non pénétrantes ou des ions ayant une plus forte affinité pour le canal; la seconde approche consiste en l'utilisation de

certaines molécules (naturelles ou synthétiques) qui bloquent de manière sélective le canal.

2.7.1 Technique utilisée pour l'étude des canaux ioniques: le patch-clamp

En 1976, Erwin Neher et Bert Sakmann ont démontré l'existence des canaux ioniques dans les membranes et leur importance au sein des réponses cellulaires (Neher et Sakmann, 1976). Pour ce faire, ils ont élaboré une technique qui allait révolutionner l'étude des propriétés électrophysiologiques des membranes biologiques: le patch-clamp (Hamill *et al.*, 1981; Neher et Sakmann, 1976). Leur travaux furent récompensés par le prix Nobel en 1991.

Le patch-clamp permet de comprendre les mécanismes de régulation des canaux ioniques et d'évaluer leur rôle dans la réponse cellulaire. Deux approches sont utilisées: le potentiel imposé et le courant imposé. La première consiste à contrôler le potentiel membranaire et à mesurer les courants unitaires (courant élémentaire) ou macroscopiques (courants totaux) traversant la membrane via les canaux ioniques. De cette manière, la voltage-dépendance des différents canaux peut être évaluée. En potentiel imposé, le patch clamp permet la caractérisation des propriétés électriques et cinétiques des canaux unitaires en configuration cellule attachée et en patch excisé (inside-out et outside-out), (pour une description de ces différentes techniques voir Hamill *et al.*, 1981). L'étude des courants macroscopiques est effectuée en configuration cellule entière ou en configuration patch perforé. La technique de courant imposé (en configuration cellule entière et patch perforé) permet de mesurer les variations du potentiel membranaire résultant des flux ioniques au travers des canaux (potentiels d'action), ce qui constitue la réponse physiologique des cellules. (Sakmann et Neher, 1995).

Les techniques de patch clamp se distinguent des techniques d'enregistrement intracellulaire par la formation d'un "gigaseal". Ceci consiste à isoler une portion de la membrane ou "patch" en scellant la pointe d'une pipette de verre (diamètre de 1 à 1,5 μm) sur la membrane cellulaire à l'aide d'une légère

succion. L'interaction membrane-verre permet l'établissement d'un scellé ou "seal" étanche entre l'intérieur de la pipette d'enregistrement et la solution extracellulaire dans le bain. L'étanchéité du seal, caractérisée par la résistance électrique entre l'intérieur de la pipette et le bain, est de l'ordre de 1 à 5 gigaOhms ($G\Omega$). Pour évaluer la résistance de l'électrode d'enregistrement et celle du seal, des sauts de potentiel de faible amplitude (-10 mV pendant 5 ms) sont appliqués à l'électrode lorsqu'elle est introduite dans le bain. La formation du seal transforme la pipette en condensateur donc les sauts de potentiel engendrent des courants capacitifs. L'augmentation de la résistance et un courant capacitif sont la signature de la formation du seal. Une forte résistance de seal est nécessaire pour optimiser la qualité des enregistrements; ainsi plus la résistance est importante et plus l'isolation électrique du patch sera complète, et plus le bruit de fond sera réduit (Odgen et Stanfield, 1994). Ceci est nécessaire car l'amplitude de certains courants enregistrés est parfois très faible (de l'ordre de 2 pA).

Différents facteurs favorisent la formation de gigaseal, notamment la composition du verre employé pour la fabrication des électrodes d'enregistrement. Le laps de temps compris entre le moment où l'électrode touche la solution extracellulaire et le moment où le seal se produit doit être le plus court possible, afin d'éviter une altération des propriétés de la pointe, une contamination de la solution interne par le milieu extracellulaire ou une fuite de la solution interne dans le bain.

2.7.1.1 Configuration cellule entière

Suivant la formation du seal, il est possible de rompre volontairement la membrane présente dans l'ouverture de la pipette par une forte succion ou un saut de potentiel de plusieurs centaines de mV. La rupture du patch se traduit par une augmentation soudaine des courants capacitifs en réponse à un saut de potentiel. Cette rupture résulte en une continuité électrique entre la pipette et le cytoplasme sans altérer la résistance du seal formé entre la pipette et la membrane (Figure 3A).

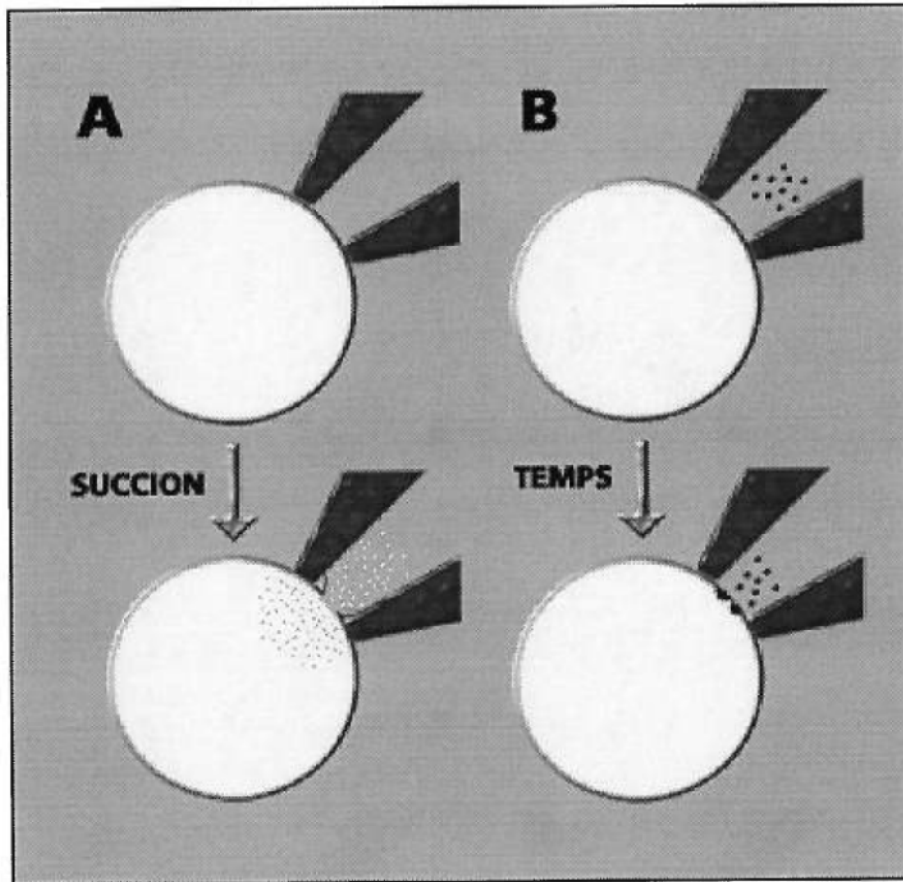
Figure 3: Configurations cellule entière et patch perforé en patch clamp

A Configuration cellule entière

La pointe d'une microélectrode d'enregistrement est apposée sur la surface cellulaire. Suivant la formation du seal, l'application d'une succion à l'intérieur de l'électrode permet de rompre le morceau de membrane isolée. Après quelques minutes, une dialyse cytoplasmique peut être mise en évidence.

B Configuration patch perforé

La pointe d'une microélectrode contenant de l'amphotéricine B (points noirs) est apposée sur la surface cellulaire. Suivant la formation du seal, et avec le temps, les molécules d'amphotéricine B partitionnent au sein de la membrane formant des canaux ioniques artificiels perméables aux cations monovalents.



Le milieu intracellulaire est en continuité avec l'intérieur de l'électrode d'enregistrement. Une connexion électrique suffisante est alors établie et un phénomène de diffusion ou dialyse passive peut être mis en évidence (Figure 3A). Cela implique que la composition ionique de la solution d'électrode doit être proche de celle du milieu intracellulaire, pour éviter de trop perturber la cellule. Cette configuration offre l'avantage d'un contrôle sur la composition du milieu intracellulaire, et permet, éventuellement, de charger la cellule à l'aide de substances pouvant bloquer directement les canaux ioniques. Cependant, le volume de l'électrode étant très nettement supérieur à celui de la cellule, on observe rapidement un lavage cytoplasmique résultant en la perte des seconds messagers solubles et des enzymes solubles.

2.7.1.2 Configuration Patch perforé

Afin de contrer la dialyse cellulaire observée en configuration cellule entière, une technique alternative a été élaborée. Cette dernière est appelée patch perforé car il s'agit essentiellement d'insérer des canaux ioniques artificiels au sein de la membrane sous l'ouverture de la pipette (Figure 3B). La pointe de l'électrode est emplie de la solution intracellulaire classique, et le reste de la pipette contient soit de l'ATP (Lindau and Fernandez, 1986), de la nystatine (Horn et Marty, 1988) ou de l'amphotéricine B (Rac *et al.*, 1991). Ces antibiotiques polyènes partitionnent au sein de la membrane, formant des pores de 0.8 nm perméables aux ions (anions et cations), à la thio-urée et au glycérol (Hille, 1992). La résistance du patch diminue et il est possible de mesurer les variations des courants membranaires. Cette technique permet l'étude des courants totaux membranaires tout en conservant l'intégrité du cytoplasme et les seconds messagers.

2.7.2 Inventaire des conductances ioniques dans les cellules somatotropes

2.7.2.1 Conductance sodiques

Deux conductances sodiques ont été décrites dans les cellules somatotropes. L'activation de l'une ou l'autre pourrait être à l'origine de la dépolarisation membranaire induite par la GH-RH.

Conductance sodique voltage-dépendante

L'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants est déclenchée par une dépolarisation membranaire. La tétródotoxine est un poison paralysant extrait des poissons globes et de certaines espèces appartenant à l'ordre des Tétráodontiformes qui bloque sélectivement les canaux sodiques voltage-dépendants, sans affecter les canaux potassiques, calciques ou la fuite (Hille, 1992). Au potentiel de repos, 40 à 70% des canaux sodiques voltage-dépendants dans les cellules somatotropes sont fermés (Kato, 1996). L'inactivation est complète à partir de -25 mV. La conductance unitaire représente le courant élémentaire traversant un canal durant un saut de potentiel test. La conductance unitaire des canaux sodiques voltage-dépendants varie entre 4 et 20 pS (Hammond et Tritsch, 1991).

Une conductance sodique voltage-dépendante a été mise en évidence dans les cellules somatotropes. Elle serait impliquée dans la sécrétion basale de la GH (Chen *et al.*, 1990a) puisque cette dernière est réduite en présence de TTX, mais n'aurait aucun rôle dans la sécrétion induite par la GH-RH (Kato *et al.*, 1988) et dans l'augmentation intracellulaire de calcium évoquée par la GH-RH (Kato *et al.*, 1992). Cependant l'étude de Kato (1996) révèle une augmentation de cette conductance en réponse au GH-RH et suggère que ce dernier augmente la probabilité d'ouverture ou le recrutement des canaux Na⁺ voltage-dépendants en réponse à la dépolarisation par une phosphorylation par la PKA.

Conductance sodique non voltage-dépendante

La seconde conductance sodique semble être un courant de fuite. Les courants de fuite sont toujours activés quelque soit la valeur du potentiel de membrane (relation courant/voltage linéaire; cf. Chapitre 3). L'existence d'une conductance de fuite sodique modulable dans les cellules somatotropes a été suggérée par Kato *et al.* en 1988. Ils ont observé que la sécrétion de GH induite par la GH-RH dans les cellules somatotropes est insensible à la TTX. De plus, la sécrétion induite par la GH-RH ou le db-AMPC est inhibée lorsque le sodium extracellulaire est remplacé par des molécules non pénétrantes (mannitol ou tris) alors que la sécrétion de GH induite par une dépolarisation provoquée par un excès de potassium extracellulaire n'est pas affectée dans un tel cas (Kato *et al.*, 1988). Il est à noter que la sécrétion de GH induite par la GH-RH et le db-AMPC est augmentée lorsque le sodium extracellulaire est remplacé par des ions Li^+ (Kato et Suzuki, 1989a). Les canaux sodiques sont perméables au lithium qui peut être utilisé comme porteur de charges pour l'étude de ces canaux. Cependant le lithium est un bloqueur des canaux potassiques rectifiant retardés (Kato et Suzuki, 1989a) et transitoires A (Kato *et al.*, 1991), ce qui se traduit par une dépolarisation soutenue de la membrane cellulaire et pourrait expliquer l'augmentation de la sécrétion de GH induite par la GH-RH en présence de Li^+ .

Takano *et al.*, 1996 ont décrit un courant de fuite non sélectif dans les cellules d'adénomes humains activé par la GH-RH. Le potentiel d'inversion de ce courant est de l'ordre de -20 à 0 mV. Le canal semble perméable aux Na, Li et K, et non perméable au tetramethylammonium (TMA) (propriétés compatibles avec celles des canaux non-sélectifs). Différentes observations suggèrent l'implication de la G_s : ce courant est activé par le 8 bromo-AMPC et la forskoline, l'activation de ce courant par la GH-RH est inhibée en présence d'inhibiteur de la PKA tels que le PKI, le Rp-AMPSc, et la H89, enfin un prétraitement des cellules avec la toxine de choléra élimine ce courant. Bien que Kato suggère l'implication d'une

conductance de fuite sodique, il n'exclut pas la possibilité que la fuite modulée par la GH-RH puisse être moins sélective (Kato et Suzuki, 1989a).

2.7.2.2 Conductances calciques

Quatre types de canaux calciques ont été décrits; cette classification s'appuie principalement sur leur sensibilité au voltage, leur conductance unitaire, leur durée d'activation respective, leur distribution tissulaire et leur pharmacologie (Fox *et al.*, 1987a,b; Llinas *et al.*, 1989): 1) les canaux de type L: courant Ca^{2+} persistant; 2) les canaux de type T: courant transitoire; 3) les canaux de type N: canaux neuronaux à haut seuil d'activation et enfin 4) les canaux de type P: canaux des cellules de Purkinje du cervelet.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous intéressons plus particulièrement aux canaux calciques de type L et de type T, car les canaux N et P ne sont pas exprimés par les cellules somatotropes.

Les canaux L sont sensibles à trois classes d'antagonistes: les dihydropyridines (nifédipine), les phénylalkylamines (vérapamile) et les benzothiazepines (diltiazem) (Catterall, 1988). Ces antagonistes n'ont pas d'effet sur les autres types de canaux calciques. Aucun antagoniste des canaux T a été identifié jusqu'à présent. L'identification du courant transitoire T est de fait effectuée par la soustraction du courant L des courants calciques totaux (T+L) en présence d'antagonistes des canaux K^+ et Na^+ .

Deux types de courants calciques voltage-dépendants ont été identifiés dans les cellules somatotropes, l'un transitoire (type T) et le second persistant (type L) (Chen et Clarke, 1995; DeRiemer et Sackmann, 1986; Sims *et al.*, 1991; Takei *et al.*, 1996). Le courant T est activé à -40 mV et atteint une valeur maximale à -10 mV. Le courant L est activé à -40 mV dans les cellules somatotropes de rat (Sims *et al.*, 1991) et à -20 mV dans les cellules somatotropes ovines (Chen et Clarke, 1995). La GH-RH augmente ces deux conductances sans en modifier les propriétés cinétiques (Chen et Clarke, 1995). Ces conductances

sont activées tant par la GH-RH que par l'AMPc, et cette activation disparaît en présence d'inhibiteurs de la PKA (H89, Rp-AMPSc ou PKI), ce qui suggère que leur activation est non seulement voltage dépendante mais également PKA-dépendante. Cependant ces canaux ne semblent pas être impliqués dans la dépolarisation membranaire puisque cette dernière est observée dans un milieu sans calcium (Kato et Suzuki, 1989b). Ils sont toutefois directement impliqués dans la sécrétion basale et phasique de la GH (Chen *et al.*, 1990c).

La GH-RH induit une augmentation rapide de la concentration intracellulaire de calcium. Cette augmentation est due à une entrée de calcium, par des canaux calciques voltage-dépendants de type-L (sensibles à la dihydropyridine), à partir du milieu extracellulaire (Lussier *et al.*, 1991a). L'entrée de calcium dans les cellules somatotropes pourrait être régulée par un effet direct du récepteur de la GH-RH sur les canaux calciques par l'intermédiaire d'une protéine G, ou résulter d'une dépolarisation membranaire induite par l'activation d'une conductance sodique. Cette dernière hypothèse semble être plus probable car la sécrétion de GH est inhibée en absence de sodium extracellulaire (Kato *et al.*, 1988; Naumov *et al.*, 1994).

2.7.2.3 Conductances potassiques

Enfin, cinq conductances potassiques ont été décrites dans les cellules somatotropes. Ces conductances sont voltage-dépendantes et sont observées à différents potentiels membranaires.

De nombreux antagonistes des canaux potassiques (spécifiques ou non) ont été décrits, mais la classification des canaux est essentiellement basée sur leurs caractéristiques d'ouvertures (potentiel d'activation, d'inactivation). D'une manière générale, toutes les conductances potassiques, à l'exception des courants SK (cf. ci-dessous), sont sensibles au TEA.

Courant entrant rectifiant I_{IR} (inward rectifier)

Le courant entrant rectifiant potassique (Inward rectifier, I_{IR}) est bloqué sélectivement par les ions barium (Ba^+). Il est très faible dans les conditions de repos (Chen *et al.*, 1994; Sims *et al.*, 1991), mais il est actif à partir de -10 mV. Ce courant est activé par la somatostatine résultant en une hyperpolarisation et une suppression des potentiels d'action (Sims *et al.*, 1991). L'inactivation du courant est lente, quelques centaines de millisecondes (Chen *et al.*, 1994). Cela pourrait également correspondre à la réponse de type I décrite par Naumov *et al.* (1994) (cf. section 2.8).

Courant transitoire I_A (transient current)

Un courant transitoire (transient outward ou I_A) est activé à -50 mV dans les cellules somatotropes ovines (Chen *et al.*, 1994) ou à -40 mV dans les cellules somatotropes de rat (Chen *et al.*, 1990b). Ce courant est activé par la somatostatine tant chez l'ovine que chez le rat (Chen *et al.*, 1990b, 1994). Il serait impliqué dans la détermination du potentiel de repos cellulaire, et joue un rôle majeur dans la régulation de la concentration intracellulaire de calcium et la sécrétion de GH (Chen *et al.*, 1994).

Courant sortant rectifiant I_K (outward rectifier)

Cette conductance est activé à -20 mV dans les cellules somatotropes de rat et d'ovins (Chen *et al.*, 1990b, 1994; Sims *et al.*, 1991). Elle ne serait pas impliquée dans le maintien du potentiel de repos mais pourrait être importante dans les réponses des cellules au GH-RH et à la somatostatine (Chen *et al.*, 1994). Chen et ses collègues ont effectivement montré en 1990, que la somatostatine augmentait cette conductance (Chen *et al.*, 1990). Elle est de plus impliquée dans la repolarisation et l'hyperpolarisation des potentiels d'action calciques (Hammond et Tritsch, 1991).

Courants sortants calcium-dépendants I_{KCa} (BK et SK)

Parmi les différents types de canaux potassiques Ca^{2+} -dépendants, deux ont été bien caractérisés et sont exprimés par la plupart des types cellulaires: les canaux SK et BK. Ces canaux diffèrent par leur conductance unitaire, leur sensibilité vis-à-vis des ions Ca^{2+} et du voltage, et par leurs propriétés pharmacologiques.

Les canaux BK sont très sélectifs aux ions K^+ et présentent une forte conductance unitaire (de l'ordre de 100 à 250 pS). Ils sont activés par les ions calcium cytosoliques (1-10 μM) et par la dépolarisation, et sont bloqués par le TEA et la charybdotoxine (venin de scorpion) (Hille, 1992).

Les canaux SK présentent une faible conductance unitaire (entre 4 et 14 pS). Ils sont plus sensibles aux ions calcium que les BK (10-100 nM), et sont très peu sensibles au potentiel membranaire; ils peuvent donc être en conformation ouverte à des potentiels très négatifs. Ils ne sont pas affectés par le TEA mais par l'apamine (venin d'abeille) (Hille, 1992).

Les cellules somatotropes normales de rat (Chen *et al.*, 1990c; Sims *et al.*, 1991), de bovins (Mason et Rawlings, 1988) ainsi que les cellules GH3 (Ritchie, 1987) possèdent une conductance I_{KCa} . La lignée cellulaires GH3 est issue d'adénomes hypophysaires de rat; ces cellules sécrètent la GH et la prolactine. En effet, l'application de cadmium (bloqueur des canaux calciques) diminue l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et le courant sortant dans les cellules somatotropes (Sims *et al.*, 1991).

Les conductances I_{KCa} sont généralement impliquées dans la post-hyperpolarisation consécutive aux potentiels d'action calciques. Des exemples de modulation de telles conductances par l'AMPC ou la PKA dans des cellules hypophysaires ont été décrits. Ainsi des analyses en patch clamp ont montré l'existence d'une inhibition significative et sélective de canaux potassiques de type BK via l'activation de la PKA par le facteur de libération de la corticotropine (CRF) et le cpt-AMPC dans les cellules AtT20 (adénome de la souris) (Shipston *et*

al., 1996). De plus, les canaux potassiques Ca-dépendants (BK et SK) participent dans la régulation de la sécrétion de prolactine par les cellules lactotrophes de l'hypophyse. Les inhibiteurs spécifiques des canaux BK et SK, la charibdotoxine et l'apamine, stimulent la sécrétion de prolactine. Ces deux antagonistes ne semblent pas avoir d'effets toxiques puisque la sécrétion induite par le TRH après l'application des antagonistes reste identique (Wang *et al.*, 1994). L'AMPc diminue une conductance potassique à des potentiels supérieurs à -10 mV dans les cellules GH4C1, et augmente par un facteur de deux le taux d'inactivation. Une analyse des courants en canaux unitaires a démontré l'existence de deux composantes: 1) une composante SK sensible à l'AMPc, lequel diminue le temps de latence pour l'entrée du canal dans un état d'inactivation prolongé; le db-AMPc augmente son temps d'inactivation; 2) une conductance BK dont le temps d'inactivation ne semble pas être affecté par le AMPc. Différents types de canaux potassiques exprimés dans une cellule ne semblent pas répondre de façon similaire à l'élévation de AMPc, et la réponse totale des courants potassiques aux seconds messagers peut être déterminée par le ratio des différents sous-types de canaux (Chung et Kaczmarek, 1995)

Courant ATP-sensible

Bernardi *et al.*(1993) ont démontré la présence de canaux potassiques modulés par l'ATP (K_{ATP}) dans les cellules sécrétant l'hormone de croissance. Ces canaux présentent une conductance unitaire de l'ordre de 26 pS et sont insensibles au voltage. Les canaux K_{ATP} sont modulés par l'ATP intracellulaire, et cette inhibition ne requiert pas une hydrolyse de l'ATP. Ils sont activés par l'ADP-Mg²⁺ et le GDP-Mg²⁺. De fait, le ratio ATP/ADP est un élément régulateur essentiel de ces canaux (Lazdunski, 1994). La sécrétion de GH induite par la GH-RH est inhibée par l'activation des canaux K_{ATP} , qui se traduit par une hyperpolarisation membranaire (De Weille *et al.*, 1992). Le rôle physiologique de ces canaux dans les cellules somatotropes et dans la régulation de la sécrétion de la GH devrait

pouvoir être évalué en mesurant les variations du métabolisme de l'ATP (augmentation de la production ou de la dégradation).

2.8 Modèle récapitulatif de la sécrétion de GH induite par la GH-RH

La sécrétion de GH dépend d'une augmentation intracellulaire de calcium qui est inhibée en absence de sodium extracellulaire (Kato *et al.*, 1988; Naumov *et al.*, 1994). Différents auteurs suggèrent que la dépolarisation membranaire induite par la GH-RH serait due à l'activation d'une conductance sodique non voltage-dépendante car elle est inhibée en absence de sodium extracellulaire et est insensible à la TTX, (Kato *et al.*, 1988; Kato et Suzuki, 1989a,b). Kato et Suzuki (1989b) ont émis l'hypothèse d'une activation directe de cette conductance par l'AMPC. Une situation similaire a été observée dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale. En effet, dans ces cellules, l'acétylcholine dépolarise la membrane par l'activation d'une conductance sodique, permettant l'activation de canaux calciques voltage-dépendants de type L (Brandt *et al.*, 1976; Kidokoro *et al.*, 1982).

Naumov *et al.* (1994) ont montré que les changements de conductance observés lors de la stimulation des cellules somatotropes par la GH-RH pourraient effectivement être médiés par le sodium. Cependant, ils ont identifié deux types de réponses parmi les cellules somatotropes répondant à la GH-RH. La réponse de type I correspondrait à l'activation d'une conductance potassique (ou moins spécifique) et d'une conductance sodique. Ces conclusions sont basées sur la valeur du potentiel d'inversion du courant entrant mesuré dans les cellules de type-I qui se situe entre -60 et -30 mV. Or ce potentiel d'inversion est très proche du potentiel de repos des cellules somatotropes, et l'activation de ces conductances ne résulterait pas en une dépolarisation membranaire. Ces auteurs proposent qu'*in vivo*, le potentiel de repos peut être plus négatif dans les cellules de type I que celui mesuré *in vitro*, compte tenu de l'inhibition tonique exercée par la somatostatine.

La réponse de type II correspondrait, quant à elle, à ce que Kato (Kato et Suzuki, 1989b) avait observé, c'est à dire l'activation d'une conductance sodique non voltage-dépendante, qui induirait une dépolarisation membranaire suffisante pour ouvrir les canaux calciques.

Toutefois, l'analyse de la courbe courant/voltage des courants mesurés en potentiel imposé dans les cellules somatotropes suggère la participation d'autres conductances ioniques outre une conductance sodique dans la dépolarisation membranaire, puisque dans tous les cas, le potentiel d'inversion du courant diffère de celui des ions Na^+ , Ca^{2+} et K^+ (Chen *et al.*, 1989; Naumov *et al.*, 1994).

A partir de ces différentes observations et expériences, trois groupes de recherche indépendants ont construit un modèle du mode d'action présumé de la GH-RH (Kato *et al.*, 1992; Lussier *et al.*, 1991a,b; Naumov *et al.*, 1994) (Figure 4).

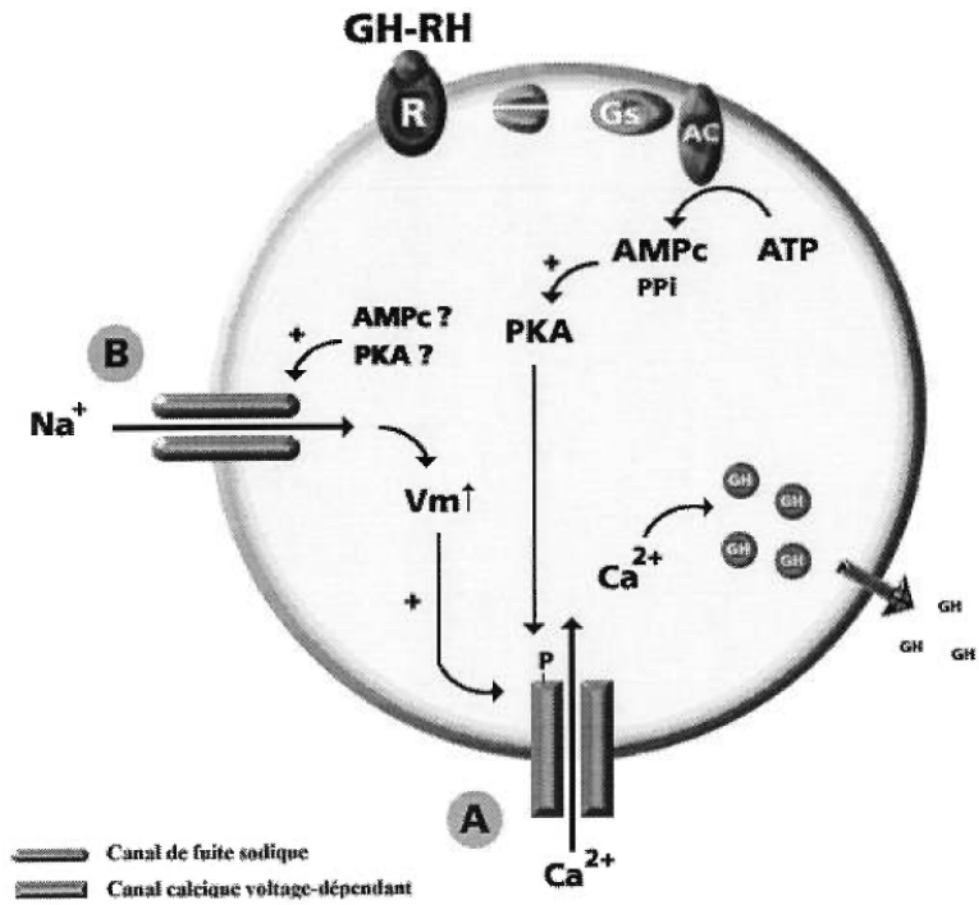
La GH-RH en se liant à son récepteur induirait l'activation d'une protéine G_s constituée de trois sous-unités: α , β et γ en catalysant la liaison de GTP sur la sous-unité α (Frohman *et al.*, 1992; Narayanan *et al.*, 1989). La sous-unité $G\alpha_s$ se dissocie du complexe $\beta\gamma$ et active la sous-unité catalytique de l'adénylate cyclase, augmentant ainsi la production d'AMPc. Ce dernier agirait de manière directe ou par l'intermédiaire d'une protéine kinase A (PKA) sur une conductance sodique non voltage-dépendante. Il en résulterait une dépolarisation membranaire de l'ordre de 10 mV, suffisante pour permettre l'ouverture de canaux calciques de type-L (voltage-dépendants) préalablement phosphorylés par la PKA. L'augmentation substantielle du calcium intracellulaire ainsi générée stimulerait la sécrétion de la GH.

2.9 Objectifs du projet

Le modèle ci-haut est, en partie, vérifié. Cependant, l'action de l'AMPc sur une conductance sodique non voltage-dépendante n'a pas été clairement

Figure 4: Modèle de la libération de GH induite par la GH-RH

La liaison de la GH-RH sur son récepteur (R) active la protéine Gs. La sous unité $G\alpha_s$ lie le GTP et active l'adénylate cyclase (AC). Cette dernière catalyse l'hydrolyse de l'ATP en AMPc et en résidus phosphate (PPi). L'AMPc active la PKA. La PKA phosphoryle le canal calcique lui conférant sa sensibilité au voltage (A). L'AMPc active directement ou par l'intermédiaire de la PKA une conductance sodique (B). Ces événements dépolarisent la membrane de quelques mV, permettant l'ouverture des canaux calciques. L'augmentation soudaine de la $[Ca^{2+}]_i$ permet l'exocytose de GH.



démontrée, et plusieurs questions restent en suspens. Notre principale préoccupation est de déterminer comment l'AMPc permet la dépolarisation des cellules somatotropes afin d'activer l'entrée de calcium nécessaire à la sécrétion de la GH. Nos objectifs sont: 1) de vérifier que l'effet dépolarisant de la GH-RH est effectivement médié par l'AMPc; 2) de vérifier que la dépolarisation induite par la GH-RH ou l'AMPc correspond à l'activation d'une conductance sodique non voltage-dépendante; 3) de caractériser les autres conductances ioniques impliquées, le cas échéant, dans les mécanismes de dépolarisation membranaire des cellules somatotropes lors de la stimulation par la GH-RH et l'AMPc et, enfin, 4) de déterminer si l'action de la GH-RH sur les conductances ioniques implique directement l'AMPc ou si elle nécessite l'activation de la PKA.

Afin de répondre à ces objectifs, nous avons mesuré les variations du potentiel membranaire des cellules somatotropes lors de la stimulation par la GH-RH et un analogue de l'AMPc. Dès lors, nous avons mesuré les variations des courants ioniques induites par le cpt-AMPc, un analogue perméant de l'AMPc, et la GH-RH, par des rampes de potentiel dans différentes conditions expérimentales. Ce mémoire consiste essentiellement en une analyse préliminaire des résultats obtenus. La richesse des informations recueillies est telle que nous avons dû restreindre notre analyse à deux valeurs de potentiel (-90 et 15 mV). Ces valeurs ont été choisies afin de maximiser les variations des courants de fuite et des courants voltage-dépendants (courants sortants). Nous ne nous sommes pas attachés aux variations du courant entrant calcique (entre -50 et -20 mV), car il a été démontré que la dépolarisation membranaire induite par la GH-RH peut être reproduite dans un milieu extracellulaire dépourvu d'ions calcium (Kato et Suzuki, 1989b) et que l'activation des canaux calciques exprimés par les cellules somatotropes dépend de la dépolarisation (Holl *et al.*, 1988a; Kato et Suzuki, 1986; Kato *et al.*, 1992; Lussier *et al.*, 1991a). Les variations de la conductance calcique nous semblait donc être un événement secondaire à la dépolarisation en accord avec les prédictions du modèle présenté ci-dessus.

3 Matériel et méthodes

Afin de mener à terme ce projet de recherche, nous avons utilisé les techniques électrophysiologiques de patch clamp en cellule-entière et en patch perforé sur des cellules somatotropes isolées de rats, fraîchement dispersées (jour 0) et mises en culture (jours 1 et 2).

La sélection des rats a été basée sur la race (Sprague-Dawley), le sexe (mâle) et le poids. Les cellules somatotropes ont été purifiées sur gradients de Percoll discontinus.

Les variations du potentiel membranaire et la modulation des courants ioniques induits par la GH-RH et des analogues exogènes de l'AMPC ont été mesurées en condition normale, en milieux extracellulaires modifiés et en présence d'inhibiteurs de la protéine kinase AMPC-dépendante.

3.1 Préparation cellulaire

3.1.1 Prélèvement de l'adénohypophyse

Cinq rats mâles Sprague-Dawley (Charles River, St-Constant, Québec) dont le poids était compris entre 200 et 225 grammes à leur arrivés ont été maintenus durant deux semaines dans une pièce dont la température et l'éclairage sont contrôlés (23 ± 3 °C; jour: 12 heures / nuit: 12 heures). Les rats furent alimentés *ad libitum* en eau et en nourriture (nourriture pour rongeurs Charles River) et hébergés par groupes de 5.

Le prélèvement des glandes avait généralement lieu entre 8h00 et 8h30 dans la salle même. Les rats ont été décapités sans anesthésie préalable puisqu'il a été démontré que les anesthésiques généraux (Chihara *et al*, 1978) stimule la sécrétion de l'hormone de croissance. Suivant la décapitation, la tête de l'animal a été rincée à l'éthanol 70%. La calotte crânienne fut coupée suivant les crêtes latérales et retirée, découvrant le cerveau et permettant son extraction (Figure 5A et 5B). L'hypophyse est alors visible au sein de la selle turcique (figure 6A). A l'aide d'une aiguille, la dure-mère fut déchirée, et les pars nervosa et intermedialis soigneusement retirées (Figure 6B). Les adénohypophyses furent rapidement prélevées et placées dans une boîte de Pétri contenant 2 ml de milieu minimum essentiel (Minimum essential medium (Gibco, 11400) + HEPES 20 mM (Sigma, St Louis, USA)) pH=7.35 à température de la pièce (MEM-H).

3.1.2 Dispersion et purification des cellules somatotropes

La dispersion et la purification des cellules somatotropes ont été effectuées en milieu stérile, sous une hotte à flux laminaire.

3.1.2.1 La dispersion

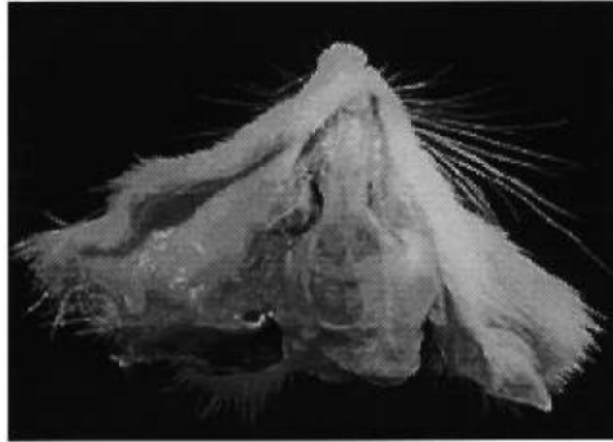
Au sortir de l'animalerie, les adénohypophyses furent placées dans une boîte de pétri contenant 2 ml de MEM-H + 0.1% albumine sérique bovine BSA (Sigma A4919) + 0.1% Trypsine (Difco 0152-13-1), (MEM-HAT). Chacune d'entre elles fut coupée en 20-25 morceaux (Figure 6C). Les tissus ont été transférés à l'aide d'une pipette pasteur silicisée dans un spinner-flask à jaquette (Celstir, Wheaton 356743) contenant 10 ml de MEM-HAT. Ce dernier était placé durant 2 heures sur un agitateur magnétique (Cafrano) réglé à 200 tpm. La jaquette du spinner-flask était maintenue à 37°C par la circulation d'eau provenant d'un bain thermostatique. La dispersion enzymatique était accompagnée d'une dispersion mécanique toutes les 20 minutes à l'aide d'une pipette pasteur silicisée dont l'ouverture a été réduite à la flamme. Au terme de deux heures,

Figure 5: Tête de rat, après décapitation

- A** Le scalp est coupé et le crâne est mis à nu.

- B** La partie supérieure du crâne est coupée le long des crêtes latérales. Le cerveau sera retiré à l'aide d'une spatule.

A



B

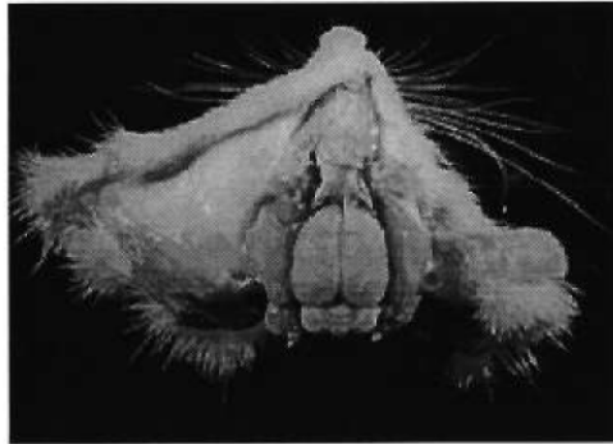
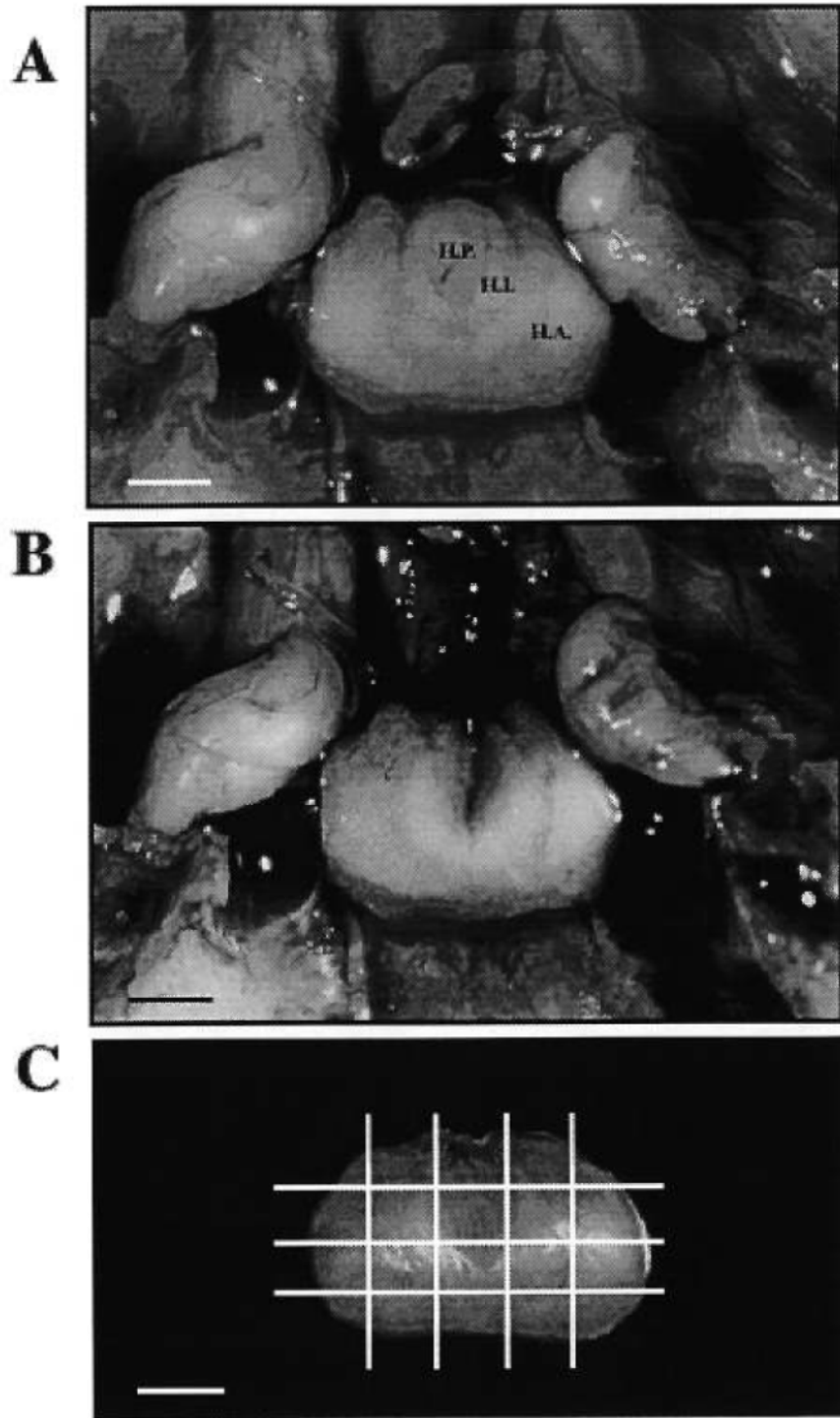


Figure 6: Hypophyse et adénohypophyse de rat *in situ*

- A** L'hypophyse *in situ* et ses trois lobes: pars nervosa au premier plan, pars intermedialis et l'adénohypophyse. H.A.: Hypophyse antérieure; H.I.: Hypophyse intermédiaire; H.P.: Hypophyse postérieure.
- B** Les pars nervosa et intermedialis ont été retirées.
- C** l'adénohypophyse est retirée de la selle turcique; le quadrillage représente le plan de coupe avant la dispersion. (échelle: 1 mm).



l'action enzymatique de la trypsine fut inhibée par l'ajout de 4 mg de LBTI (inhibiteur de la trypsine extrait des haricots de Lima) dissoute dans 200 μ l de MEM-H.

3.1.2.2 La purification

Les cellules hypophysaires dispersées furent centrifugées à 500 g durant 10 minutes puis re-suspendues dans 2 ml de milieu 199 (Gibco 21200) - HEPES 20 mM (M199-RT) à pH 7.35 à la température de la pièce.

La purification des cellules somatotropes a été effectuée suivant la procédure des gradients de percoll discontinus en deux étapes décrite par French *et al.* (1990). Cette dernière assure une préparation homogène de cellules somatotropes à 94%. Les gradients de percoll ont été préparés à partir d'une solution initiale de Percoll: 9 parties de Percoll (Pharmacia 17-0891-01) pour 1 partie de M199 10x (Gibco 11181) - HEPES 200 mM. Les densités furent ajustées aux valeurs requises à l'aide de M199 + HEPES 20 mM (M199 HP) à pH 7.4 à la température de la pièce. Les solutions constituant le premier gradient (couche 1: 1.069 g/cm^3 (53.7% volume de la solution initiale/v); couche 2: 1.086 g/cm^3 (67.7% volume de la solution initiale /v)) furent placées sous la suspension cellulaire à l'aide d'une seringue munie d'un tube de polyéthylène en débutant par la moins dense. Les gradients ont été centrifugés à 1000g durant 20 minutes à la température de la pièce. Les cellules présentes à l'interface entre les deux solutions de Percoll furent récoltées et rincées, puis re-suspendues dans le M199-RT pour le second gradient (couche 1: 1.076 g/cm^3 (58.8% volume de la solution initiale /v); couche 2: 1.086 g/cm^3 (67.7% volume de la solution initiale /v)). Après une seconde centrifugation, les cellules présentes à l'interface des deux solutions de percoll furent prélevées.

La proportion moyenne de cellules somatotropes ainsi purifiées variait de 10 à 20% de la quantité initiale de cellules hypophysaires dispersées. Les cellules somatotropes furent rincées dans le M199-RT puis re-suspendues dans du

DMEM-SHA (DMEM (Gibco 31600-034) + 10% NewBorn Calf Serum (Gibco 16010-035) + 10 nM dexaméthasone (Sigma D-8893) + triodothyronine (Sigma T-5516) + 50 U/ml penicilline G + 50 µg/ml streptomycine (PenStrep Gibco 15145), tamponé avec NaHCO₂ 28 mM, et 5% CO₂ à pH=7.37 à 37°C). Il a été démontré que le dexaméthasone augmente les niveaux de ARN messagers des récepteurs du GH-RH dans les cellules pituitaires de rat (Tamaki *et al*, 1996). Chez le rat la triodothyronine active le gène de la GH (Suen et Chin, 1993).

Une partie des cellules fut prélevée pour un usage immédiat, alors que la majorité fut mise en culture dans des boîtes de Pétri contenant une lamelle préalablement traitée avec de la Poly-O-ornithine (P-3655, Sigma). Les boîtes de Pétri (contenant en moyenne 250,000 cellules) furent mises en culture dans un incubateur (95:5 Air:CO₂, 37°C en condition humide). 97% des cellules somatotropes ainsi purifiées étaient vivantes (test d'exclusion au bleu de Trypan; Sigma, T8154)

3.2 Stimulation des cellules somatotropes

Les cellules somatotropes fraîchement dispersées (jour 0) ou mises en culture (jours 1 et 2) ont été stimulées avec GH-RH 100 nM de rat (Peninsula laboratoires, Inc. 8068), cpt-AMPC 0.5 mM (C-3912, Sigma) ou db-cAMP 5 mM (D-0627, Sigma).

Nous avons choisi des concentrations maximales afin d'optimiser la réponse des cellules somatotropes lors des enregistrements. La GH-RH et les analogues de l'AMPC ont été dissouts dans le milieu extracellulaire dominant pour chaque protocole.

3.3 Electrophysiologie

3.3.1 Poste d'enregistrement

Le poste d'enregistrement utilisé comprenait:

- 1) un microscope inversé (Olympus TMD-2) posé sur une table anti-vibration. Cette dernière était placée dans une cage de Faraday. La mise à la terre était adéquate, assurant un bruit de fond inférieur à 2 pA;
- 2) un amplificateur de patch clamp et générateur d'impulsion EPC-9 (HEKA);
- 3) un micromanipulateur hydraulique relié à la sonde de l'amplificateur de patch-clamp qui comprenait la nacelle supportant la pipette d'enregistrement;
- 4) une platine chauffante dont la température était régulée à 37°C par un contrôleur de température (TC-102, Medical Systems Corp.);
- 5) un système d'éjection par pression Picospritzer (General Valve Corporation);
- 6) un oscilloscope (BK Precision 2522A);
- 7) un ordinateur Macintosh® et un logiciel d'acquisition Pulse (HEKA);

Les cellules dispersées et purifiées furent placées sur une lamelle de verre ronde dans une boîte de Pétri sous le microscope. Le bain extracellulaire était maintenu à 37°C par la platine chauffante. Un système de périfusion a été mis en place afin que le milieu extracellulaire soit continuellement renouvelé.

3.3.2 Acquisition des données

Le potentiel et le courant de pipette ont été mesurés et amplifiés par l'amplificateur de patch clamp. La fréquence d'acquisition du courant dans les conditions de voltage clamp était de 2KHz (sauts de potentiel) et 1 KHz (rampes de potentiel). Les courants ont été traités avec un filtre analogique passe-bas (Bessel quadripolaire) de 2,9 KHz.

Les variations du potentiel et du courant de pipette amplifiés ont été visualisées sur un oscilloscope analogique et sur un oscilloscope numérique (Pulse).

Le logiciel d'acquisition Pulse permet non seulement la visualisation des données, mais offre également un contrôle sur les paramètres d'enregistrement et le déclenchement des éjections par le Picospritzer.

Les données brutes ont été enregistrées sur le disque dur de l'ordinateur en format binaire, puis sauvegardées sur disquettes ou cartouches Zip de Ioméga® pour un traitement subséquent.

3.3.3 Fabrication des électrodes d'enregistrements

Le verre utilisé pour la fabrication des électrodes d'enregistrement était le verre borosillate Corning 7052 (PG52151-4, World Precision Instruments, Inc.). Ce verre contient peu d'aluminium et une quantité négligeable de plomb. Les paramètres d'étirement (Etireuse verticale Narishige PP-83) ont été ajustés afin d'obtenir une pipette d'enregistrement dont la résistance est comprise entre 1 et 2.5 M Ω (équivalent à un diamètre de pointe compris entre 1 et 1.5 μm). La pointe de chaque électrode fut polie à l'aide d'un filament chauffant en platine (microforge). Les pipettes furent utilisées immédiatement après leur fabrication afin d'éviter une accumulation de particules de poussières microscopiques sur les pointes.

L'électrode d'enregistrement était remplie d'une solution "intracellulaire", faite au laboratoire, respectant les concentrations ioniques cytoplasmiques. La pointe fut plongée dans la solution assurant son remplissage par capillarité; le reste de la pipette fut emplie à l'autre extrémité à l'aide d'une seringue étirée à la flamme. Les bulles d'air formées à l'interface furent soigneusement évacuées.

La connexion électrique entre la pipette et la sonde de l'amplificateur de patch-clamp était assurée par un fil d'argent chloruré (Ag/AgCl). L'électrode de référence consistait en un fil d'argent chloruré (Ag/AgCl) placé dans un pont d'Agar (Agar dissout dans 1 ml de la solution intracellulaire d'enregistrement).

3.3.4 Patch-clamp: enregistrements en configurations cellule-entière classique et patch perforé

Les enregistrements présentés dans le cadre de ce mémoire ont été obtenus en patch clamp en configuration cellule entière et patch perforé, tant dans les conditions de courant imposé que de voltage imposé.

Un exemple de cellule somatotrope de rat (jour 1) en patch clamp est présenté sur la Figure 7.

3.3.4.1 Cellule entière classique

Lors des enregistrements en cellule entière, nous avons enrichi la solution intracellulaire d'ATP et de GTP. Ces derniers sont, en effet, impliqués dans la transduction du signal induit par la GH-RH et sont perdus lors de la dialyse.

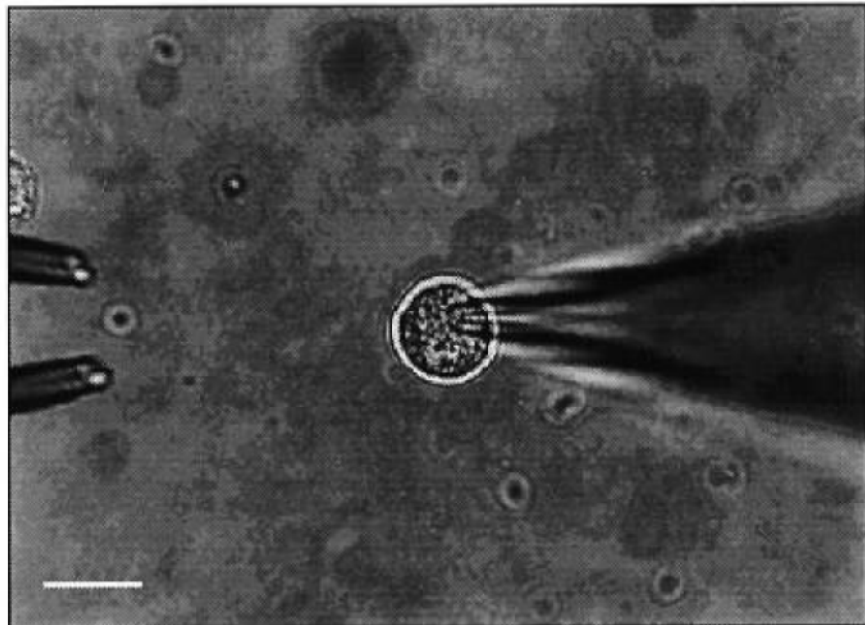
La configuration en cellule entière a été choisie dans le cadre de ce projet comme contrôle afin de valider les résultats obtenus en configuration patch perforé. Elle a été utilisée principalement dans les enregistrements en courant imposé avec le cpt-AMPC, et pour certains protocoles en voltage imposé avec le cpt-AMPC.

3.3.4.2 Patch perforé

La configuration patch perforé a été utilisée pour l'étude des variations du potentiel membranaire et des courants ioniques induites par la GH-RH et le cpt-AMPC. Nous avons utilisé l'amphotéricine B (Sigma A-4888) selon la méthode décrite par Rae et al (1991). Une solution initiale d'amphotéricine B dissoute dans du DMSO (60 mg/ml) fut diluée dans la solution intracellulaire afin d'obtenir une concentration d'antibiotique finale de 360 µg/ml.

Figure 7: Cellule somatotrope de rat en patch clamp

Une microélectrode constituée d'un capillaire de verre étiré est déposée sur la surface membranaire (à droite); la formation du seal est assurée par l'application d'une succion à l'intérieur de l'électrode. Les milieux extracellulaires modifiés, les analogues de l'AMPc et la GH-RH sont éjectés dans l'environnement immédiat des cellules à l'aide d'un système d'éjection par pression à deux pipettes (à gauche) (échelle 10 μm).



3.4 Protocoles d'enregistrement électrophysiologique

3.4.1 Étude des variations du potentiel membranaire

Les variations du potentiel membranaire ont été mesurées en courant imposé en configuration cellule entière (analogue exogène de l'AMPC) et en configuration patch perforé (GH-RH). Le potentiel membranaire a été enregistré durant 3 minutes consécutives. L'éjection par pression (20 à 120 sec) fut déclenchée durant l'enregistrement. Cette technique a été utilisée en dépit de la dialyse cellulaire observée en cellule entière, car les mesures sont effectuées en deçà de 4 minutes après la formation du seal.

3.4.2 Étude des modulations des courants ioniques voltage-dépendants

Cette étude est basée sur la comparaison des relations courant/voltage (I/V) mesurées en milieu normal et en milieux modifiés.

3.4.2.1 Courbe courant-voltage en sauts de potentiel

Le potentiel de maintien a été fixé à -60 mV. Les cellules furent assujetties à des sauts de potentiels croissants de 10 mV, allant de -100 à +20 mV, d'une durée de 500 ms chacun. Les courbes I/V ont été obtenues en calculant le courant moyen sur la seconde moitié de chaque saut de potentiel afin d'éliminer la participation des courants transitoires dans les courants totaux. Ce protocole a été utilisé dans le cadre de cette étude afin de valider les résultats obtenus en rampe de potentiel et nous n'avons testé que le cpt-AMPC en milieu normal.

3.4.2.2 Courbe courant-voltage en rampe de potentiel

Le potentiel de maintien a été fixé à -60 mV. Nous avons soumis la cellule à une rampe de potentiel continue de -100 à +20 mV à un taux de 120 mV/s, et nous avons mesurés les courants générés. Ceci nous renseigne sur l'intensité des courants en fonction du potentiel membranaire. Les courants transitoires tels que

les courants calciques de type T et les courants potassique I_A ne peuvent être mesurés dans ce type de protocole. Pour chaque cellule, nous avons enregistré une rampe témoin, et une rampe par milieu extracellulaire testé jusqu'à concurrence de 5 rampes par cellule.

3.5 Solutions d'enregistrement

3.5.1 Les solutions intracellulaires

Selon la configuration de patch clamp choisie pour l'enregistrement des variations des courants et potentiel membranaires, différentes solutions intracellulaires ont été utilisées (cf. Tableau 1).

En configuration cellule entière classique, la solution intracellulaire contenait: K-gluconate 140 mM, HEPES 10 mM, $MgCl_2$ 2 mM, $CaCl_2$ 0,4 mM et EGTA-K 1 mM (pH 7.2 à température de la pièce). La solution d'enregistrement était enrichie d'ATP 2 mM et de GTP 2 mM (solution intracellulaire A).

En configuration patch perforé, la solution de base (solution intracellulaire B) contenait: K_2SO_4 70 mM, HEPES 10 mM, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, Mannitol 50 mM et EGTA-K 1 mM (pH 7.2 à température de la pièce). La solution d'enregistrement (solution intracellulaire B') contenait 360 $\mu g/ml$ d'amphotéricine B préparée à partir de la solution initiale d'amphotéricine B.

La technique du patch perforé repose essentiellement sur la formation de canaux artificiels restreinte au patch de membrane. Afin d'éviter la formation de canaux artificiels sur l'ensemble de la membrane, nous avons empli la pointe de l'électrode avec la solution intracellulaire B (qui ne contient pas d'amphotéricine B), et le reste de la pipette avec la solution intracellulaire B'. Selon Rae *et al* (1991), dans ces conditions, les molécules d'amphotéricine B diffusent au travers de la pointe de l'électrode durant environ 2 minutes après que les deux solutions

Tableau 1: Composition (mM) des solutions intracellulaires

Solutions	A	B	B'	C	C'
	K-Gluconate	K ₂ SO ₄	K ₂ SO ₄	Cs ₂ SO ₄	Cs ₂ SO ₄
K-Gluconate	140	-	-	-	-
K ₂ SO ₄	-	70	70	-	-
Cs ₂ SO ₄	-	-	-	70	70
HEPES	10	10	10	10	10
MgCl	2	-	-	-	-
NaCl	-	10	10	10	10
KCl	-	10	10	10	10
Mannitol	-	50	50	50	50
CaCl ₂	0,4	-	-	-	-
EGTA-K	1	1	1	1	1
ATP	2	-	-	-	-
GTP	2	-	-	-	-
Amphotéricine B	-	-	0,360	-	0,360

soient mises en contact, ce qui est grandement suffisant pour assurer la formation du seal et éviter une contamination du bain extracellulaire par l'antibiotique.

Dans certains protocoles en patch perforé, nous avons utilisé une troisième solution intracellulaire contenant des ions césium. Ces derniers bloquent les canaux potassiques à partir de la face intracellulaire de la membrane; leurs effets s'additionnent à ceux du TEA présent dans le milieu extracellulaire. La solution de base (solution intracellulaire C) contenait: Cs_2SO_4 70 mM, HEPES 10 mM, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, Mannitol 50 mM et EGTA-K 1 mM (pH 7.2 à température de la pièce). La solution d'enregistrement (solution intracellulaire C') contenait 360 $\mu\text{g/ml}$ d'amphotéricine B préparée à partir de la solution initiale d'amphotéricine B. La pointe de l'électrode a été emplie avec la solution intracellulaire C pour les raisons décrites précédemment.

3.5.2 Les solutions extracellulaires

3.5.2.1 Système d'éjection

La GH-RH, les analogues exogènes de l'AMPc ainsi que les milieux modifiés (cf. ci-dessous) ont été éjectés dans l'environnement immédiat des cellules par un système d'éjection par pression Picopritzer. Afin d'éviter des problèmes d'oxydation des substances éjectées, nous avons utilisé l'azote comme gaz propulseur (pression 40 kPa). Les pipettes d'éjection étaient constituées d'un capillaire hématocrite (Fisherbrand 02-668-68). La pointe de la pipette fut cassée sur le fond de la boîte de pétri avant l'enregistrement afin d'obtenir un diamètre de 1 à 5 μm). Le système d'éjection fut systématiquement testé en début d'expérience afin de s'assurer qu'aucune bulle d'air ne s'opposait à l'écoulement des solutions.

3.5.2.2 Etude de la modulation des courants de fuite

Afin de vérifier si la dépolarisation induite par la GH-RH résulte de l'activation d'une conductance sodique dans les potentiels négatifs, nous avons mesuré les courants membranaires totaux entrants en milieu normal et en milieux modifiés (cf. Tableau 2). Le potentiel de repos a été fixé à -60 mV. Le milieu normal était une solution de Hanks modifiée contenant: NaCl 135 mM, KCl 5.6 mM, HEPES 10 mM, dextrose 5 mM, NaHCO₃ 4 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 0.8 mM, pH 7.37 à 37°C (HBSS-2Ca²⁺).

3.5.2.2.1 Témoins

L'effet de GH-RH 100 nM et de 0.5 mM cpt-AMPC sur les courants totaux a été évalué après une éjection de 2 minutes en rampes de potentiel ou par sauts de potentiel (cpt-AMPC seulement pour ce dernier protocole). Les deux substances ont été éjectées par le système d'éjection par pression; le bain extracellulaire contenait la solution HBSS-2Ca²⁺.

3.5.2.2.2 Modulation d'une conductance de fuite

Les courants sodiques ont été isolés dans un milieu appauvri en calcium (2 mM EGTA + 0Ca²⁺) contenant un bloqueur des canaux potassiques (TEA 10 mM) (HBSS-0Ca²⁺ + TEA). Le bain extracellulaire était constitué de HBSS-2Ca²⁺; le milieu HBSS-0Ca²⁺ + TEA, ainsi que la GH-RH et le cpt-AMPC (dilués dans le HBSS-2Ca²⁺) furent éjectés dans l'environnement immédiat de la cellule par le système d'éjection par pression. Ces enregistrements ont été réalisés en cellule entière avec la solution intracellulaire A pour le cpt-AMPC, et en patch perforé avec la solution intracellulaire B' pour le cpt-AMPC et la GH-RH.

Afin de vérifier si d'autres conductances de fuite sont modulées dans les potentiels négatifs par la GH-RH et l'AMPC nous avons utilisé un milieu appauvri en sodium (choline 113 mM) et contenant un bloqueur des canaux potassiques (TEA 22 mM) (HBSS-0Na⁺ + TEA). Lors des enregistrements, le bain

Tableau 2: Composition (mM) des différents milieux extracellulaires

Milieu	HBSS-2Ca ²⁺	HBSS-TEA ^a	HBSS-TEA ^b	HBSS-0Ca/TEA	HBSS-ONa/TEA	HBSS-H89	HBSS-Rp-AMPSc
Choline Cl	-	-	-	-	113	-	-
NaCl	135	113	125	125	-	135	135
KCl	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
HEPES	10	10	10	10	10	10	10
Dextrose	5	5	5	5	5	5	5
NaHCO ₃	4	4	4	4	4	4	4
CaCl ₂	2	2	2	-	2	2	2
MgCl ₂	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
TEA	-	22	5,7	10	22	-	-
EGTA-Na	-	-	-	2	-	-	-
H89	-	-	-	-	-	0,003	-
Rp-cAMPS	-	-	-	-	-	-	0,1

extracellulaire était constitué de la solution HBSS-TEAa. Le milieu HBSS-0Na⁺ + TEA, ainsi que la GH-RH et le cpt-AMPC (dilués dans le HBSS-TEAa) ont été éjectés dans l'environnement immédiat des cellules à l'aide du système d'éjection par pression. Entre chaque enregistrement, la solution extracellulaire était constituée d'une solution HBSS-2Ca²⁺ afin de limiter l'exposition des cellules au milieu HBSS-TEAa. Ces enregistrements ont été réalisés en patch perforé cpt-AMPC et GH-RH avec la solution intracellulaire C'.

Enfin, pour vérifier si cette conductance est activé par l'AMPC ou par la PKA, nous avons utilisé des inhibiteurs de la PKA: la N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89) (Chijiwa *et al*, 1990; Geilen *et al*, 1992) (3 µM) et l'isomère Rp de l'adénosine 3',5'-phosphorothioate cyclique (Rp-AMPC; 1375 423, Boehringer Mannheim) (Rothermel et Botelho, 1988) (100 µM) dilué dans un milieu HBSS-2Ca²⁺. Le temps d'incubation initial était de 30 minutes, et le bain extracellulaire était renouvelé chaque 20 minutes. Ces enregistrements ont été réalisés en patch perforé avec la solution intracellulaire C' (cpt-AMPC ou GH-RH).

3.5.2.3 Etude de la modulation des courants sortants

Afin de vérifier si la dépolarisation induite par la GH-RH résulte de l'inhibition d'une conductance potassique dans les potentiels positifs, nous avons mesuré les courants membranaires totaux sortants en milieu normal et en milieux modifiés. Le potentiel de maintien a été fixé à -60 mV.

3.5.2.3.1 Témoins

L'effet de GH-RH 100 nM et de cpt-AMPC 0,5 mM sur les courants totaux des cellules somatotropes a été évalué en rampes de potentiel ou par sauts de potentiel (cpt-AMPC seulement pour ce dernier protocole). Les enregistrements ont été effectués durant l'éjection au terme de 2 minutes. Les deux substances ont

été éjectées par le système d'éjection par pression; le bain extracellulaire contenait la solution HBSS-2Ca²⁺.

3.5.2.3.2 Modulation d'une conductance sortante

Les différents milieux modifiés utilisés consistaient essentiellement en des milieux appauvris en calcium (2 mM EGTA + 0Ca²⁺) et/ou contenant un bloqueur des canaux potassiques (TEA 5.7 ou 10 mM). Le bain extracellulaire était constitué de la solution HBSS-2Ca²⁺. Les milieux modifiés (HBSS-TEAb; HBSS-0Ca²⁺ et HBSS-0Ca²⁺+TEA, cf. Tableau 2) ainsi que le cpt-AMPC et la GH-RH (dilués dans le HBSS-2Ca²⁺) ont été éjectés dans l'environnement immédiat des cellules à l'aide d'un système d'éjection par pression. Ces enregistrements ont été réalisés en configuration cellule entière avec la solution intracellulaire A (cpt-AMPC), et en configuration patch perforé avec la solution intracellulaire B' (cpt-AMPC ou GH-RH).

L'implication de l'AMPC ou de la PKA dans l'inhibition partielle de cette conductance a été évaluée dans un milieu normal contenant H89 3 µM ou Rp-AMPSc 100 µM. Le temps d'incubation initial était de 30 minutes, et le bain était renouvelé chaque 20 minutes. Ces enregistrements ont été réalisés en configuration avec la solution intracellulaire B' pour le cpt-AMPC (Rp-AMPSc et H89), le db-AMPC (Rp-AMPSc), et la GH-RH (Rp-AMPSc et H89).

3.6 Analyses des données

3.6.1 Correction pour la résistance de série

Le circuit équivalent utilisé pour décrire les enregistrements en cellule entière est présenté à la Figure 8. Le courant est défini comme un flux de charges positives allant de la pipette vers la membrane. Il existe une résistance en série avec la membrane représentée par la résistance de série. Cette dernière correspond à la somme de la résistance de la pipette et de la résistance du "trou" (cellule entière)

Figure 8: Circuit équivalent de la membrane en configuration cellule entière

Cm: Condensateur

ic: Courant traversant le condensateur de la membrane Cm (membrane + espaces extra- et intracellulaires)

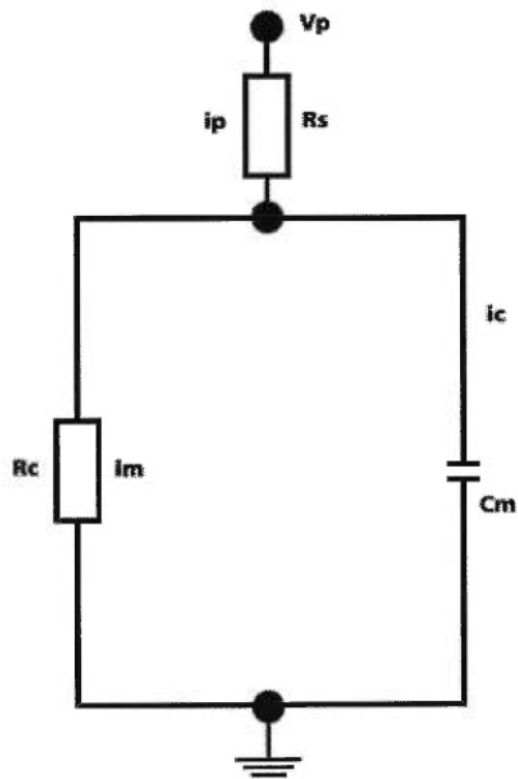
ip: Courant de pipette ($ip = ic + im$)

im: Courant traversant la résistance de la membrane Rs (canaux ioniques)

Rc: Résistance de la cellule

Rs: Résistance de série

Vp: Potentiel dans la pipette d'enregistrement



ou des canaux artificiels créés par l'antibiotique (patch perforé) dans la membrane sous l'ouverture de l'électrode. Lorsque le courant traverse la membrane, cette résistance introduit une erreur entre le potentiel mesuré (contrôlé par l'amplificateur de patch) et la différence de potentiel réelle de part et d'autre de la membrane. L'erreur est décrite par le produit du courant dans la pipette d'enregistrement et de la résistance de série ($I_p \times R_s$); l'erreur est d'autant plus grande que les courants traversant la membrane sont importants.

La plupart des amplificateurs de patch permettent une compensation à priori de la résistance de série, par l'ajout d'un signal de potentiel proportionnel au courant membranaire à l'aide d'un circuit de rétroaction positive; celle-ci peut être de l'ordre de 80 à 90% (Cahalan et Neher, 1992).

La résistance de série pose souvent des problèmes lors des enregistrements en cellule-entière. Avec cette technique, la pipette de patch est utilisée tant pour la mesure du potentiel de membrane, que pour l'injection de courant dans la cellule. Cela signifie que la résistance de la pipette (de l'ordre de quelques $M\Omega$), contribue à la résistance de série. Dans les techniques de patch, les résistances d'accès sont souvent 2 à 10 fois plus importantes qu'en cellule entière classique; les problèmes reliés à la résistance de série sont de fait amplifiés. Il est donc important de mesurer la résistance de série, et d'évaluer l'erreur sur le potentiel à partir de la valeur maximale du courant (Cahalan et Neher, 1992).

Les cellules somatotropes utilisées dans le cadre de ce projet ne supportaient pas une compensation à priori de la résistance de série. De fait, nous avons utilisé une correction à postériori. Nous avons compensé pour les variations de R_s d'une rampe de potentiel à l'autre pour une même cellule. Il est à noter que la partition des antibiotiques utilisés en patch perforé évolue en fonction du temps et cette variation influence d'autant plus l'erreur commise sur le potentiel. La correction suivante a été utilisée:

étape 1: le potentiel V_p est filtré (filtre numérique non-récurrent, fenêtre de 10,5 msec)

étape 2: le courant i_p est filtré (filtre numérique non-récurrent, fenêtre de 30,5 msec)

étape 3: compensation pour la résistance de série selon la formule suivante:

$$V_m = V_p - (R_s \text{ test} - R_s \text{ contrôle}) \cdot i_p$$

V_m = différence de potentiel réelle de part et d'autre de la membrane

V_p = potentiel de la pipette d'enregistrement

$R_s \text{ test}$ = Résistance de série mesurée lors du test

$R_s \text{ contrôle}$ = Résistance de série mesurée lors de l'enregistrement témoin

i_p = courant de pipette

étape 4: le potentiel V_m est trié en ordre croissant.

3.6.2 Statistiques

Afin d'éliminer les variations entre les cellules, nous avons exprimé les courants en fonction du courant maximal exprimé par la cellule pour une valeur de potentiel donnée (variable i / i_{max}). C'est cette dernière variable qui a été utilisée pour l'étude statistique.

La distribution des mesures effectuées dans les différents protocoles n'obéissant pas à la loi normale, nous avons utilisé deux approches statistiques:

- pour les protocoles ne comprenant que 2 groupes, nous avons utilisé le test non-paramétrique Mann Whitney U avec un taux de signification de 5%.
- pour les protocoles comprenant 3 groupes ou plus, nous avons effectué un test de Kruskal-Wallis (taux de signification de 5%) afin de déterminer s'il existe une hétérogénéité au sein des groupes; le cas échéant, nous avons déterminé quels groupes étaient responsables de cette hétérogénéité à l'aide d'un test non-paramétrique de comparaisons multiples (taux de signification de 5%) tel que

décrit dans Scherrer (1984). Ce test nous permet de comparer les différents groupes les uns par rapport aux autres.

Ces deux tests non-paramétriques comparent la distribution des rangs des différentes groupes testés. De fait, les variations significatives présentées ne dépendent pas de l'erreur type, de l'écart type ou des valeurs elles-mêmes. Nous avons, toutefois, choisi de présenter les résultats sous forme de pourcentages plus ou moins l'erreur type. Les pourcentages correspondent à la moyenne des changements relatifs pour chaque cellule. Ceci implique que des variations telles que $6 \pm 6\%$ correspondent à des variations réelles et donc à un effet direct des substances étudiées (certaines cellules présentent de faibles variations alors que d'autres présentent des variations plus marquées).

Dans le chapitre suivant, nous décrirons les effets observés du cpt-AMPC et de la GH-RH sur les cellules somatotropes. Chaque effet décrit correspond à une différence statistiquement significative (taux de signification de 5%) entre le témoin et le test (sauf indication contraire).

4 Résultats

Ce chapitre comprend six grandes parties. Dans la première partie, nous présenterons les caractéristiques générales des cellules somatotropes utilisées dans cette étude. Dans la seconde partie, nous montrerons que l'effet dépolarisant de la GH-RH peut être reproduit par un analogue de l'AMPc (le cpt-AMPc). Dans la troisième partie, nous discuterons de notre approche expérimentale. Dans la quatrième partie, nous décrirons les effets respectifs du cpt-AMPc et de la GH-RH sur les courants totaux. Les différents courants modulés par le cpt-AMPc et la GH-RH seront identifiés dans la cinquième partie. Enfin, nous montrerons que la modulation de ces courants dépend soit d'un effet direct de l'AMPc, soit de l'activation de la PKA.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus sur un ensemble de 305 cellules somatotropes de rat (la distribution des cellules selon les différents protocoles expérimentaux est présentée dans le Tableau 3).

4.1 Observations générales

Les cellules somatotropes sont rondes, de petite taille (diamètre de l'ordre de 12 μm) et très granuleuses. La granulation du cytoplasme tend à diminuer après 1 à 2 jours en culture, demeurant toutefois importante. Le choix des cellules lors des enregistrements a été basé sur les critères suivants: forme ronde, contour

Tableau 3: Nombre total de cellules somatotropes de rat testées selon les différents protocoles utilisés

	Protocole	HBSS-2Ca	HBSS H89	cpt-AMPC cellule entière	cpt-AMPC perforé	db-cAMP perforé	GH-RH perforé
Voltage imposé	I/V rampe	11	7	16	24	-	28
	HBSS 2Ca	-	-	15	13	-	10
	HBSS 0Ca	-	-	12	8	-	13
	HBSS TEA	-	-	13	9	-	9
	HBSS 0Ca/TEA	-	-	-	14	-	10
	HBSS 0Na/TEA/Cs	-	-	-	7	9	7
	HBSS H89	-	-	-	9	-	5
	HBSS Rp-AMPSc	-	-	-	-	-	-
I/V sauts	-	-	8	-	-	-	
Courant imposé	HBSS 2Ca	-	-	19	9	-	20
	TOTAL						305

cellulaire marqué et forte granulation cytoplasmique (la Figure 7, dans le Chapitre 3, montre une cellule de jour 1 en patch clamp).

Les caractéristiques membranaires et le comportement des cellules somatotropes observées dans le cadre de cette étude corroborent les observations décrites auparavant (Kato, 1996; Naumov *et al.*, 1994). En effet, le potentiel de repos des cellules somatotropes de rat varie entre -60 et -20 mV (Kato, 1996; Naumov *et al.*, 1994); nous avons évalué ce dernier aux environs de -20 mV sur un grand nombre de cellules. Les expériences ont été réalisées à 37°C, une température très proche de la température physiologique. L'aspect cellulaire (forme et granulation cytoplasmique) ainsi que l'amplitude des courants mesurés indiquent que les cellules étaient saines.

De plus, pour les enregistrements en rampes de potentiel en voltage imposé, les cellules ne répondant pas aux conditions suivantes ont été éliminées de l'étude: 1) le courant membranaire peut être mesuré directement à -90 et/ou 15 mV après correction pour la résistance de série; 2) la durée minimale de l'éjection de cpt-AMPC ou de GH-RH est de 2 min. (à l'exception des cellules testées avec le cpt-AMPC en présence de Rp-AMPSc), 3) le seal reste stable durant l'expérience et enfin 4) la cellule ne présente pas de courant rectifiant entrant dans les conditions témoins.

4.2 La GH-RH et le cpt-AMPC dépolarisent les cellules somatotropes

Les cellules somatotropes sont des cellules endocrines excitables présentant des potentiels d'action (P.A). Le potentiel de repos des cellules testées en courant imposé était maintenu entre -45 et -55 mV afin de mettre en évidence cette activité (-51 ± 1 mV, n=48). 56% des cellules somatotropes de rat testées au jour 0 (n=28/48) présentaient des potentiels d'action (cellule entière et patch perforé); les 20 autres cellules ne présentaient pas d'activité spontanée quel que soit le potentiel de repos.

Nous souhaitons vérifier si la GH-RH dépolarise les cellules somatotropes, et si cet effet peut être reproduit par l'AMPc. Pour ce faire, nous avons enregistré le potentiel membranaire durant 3 min. dans les conditions de courant imposé. L'éjection de GH-RH 100 nM (patch perforé) ou de cpt-AMPc 0,5 mM (cellule entière et patch perforé) a été déclenchée en dedans de quelques secondes suivant le début de l'enregistrement.

La GH-RH induit une dépolarisation membranaire de l'ordre de 9 ± 1 mV; et cela tant dans les cellules actives (Figure 9A) que dans les cellules silencieuses (Figure 10A). De plus, la fréquence des potentiels d'action est augmentée par la GH-RH dans les cellules actives.

Le cpt-AMPc dépolarise également les cellules somatotropes actives et silencieuses (Figure 9B et C; Figure 10B et C). La dépolarisation moyenne observée est de 9 ± 1 mV en configuration cellule entière (n=19) et de 11 ± 1 mV en configuration patch perforé (n=9). L'effet dépolarisant du cpt-AMPc est soutenu, et la fréquence des potentiels d'action dans les cellules actives est augmentée.

Ces résultats suggèrent que les effets dépolarisants de l'AMPc sont effectivement similaires à ceux de la GH-RH.

4.3 Validation de l'utilisation des rampes de potentiel dans l'étude des courants

4.3.1 La relation I/V classique et par rampe de potentiel

La relation I/V des cellules somatotropes peut être évaluée selon deux approches (Figure 11). La première est dite relation I/V classique; elle est obtenue en soumettant la membrane à des sauts de potentiel croissants de 10 mV d'une durée de 500 ms de -100 à +20 mV. Les cellules somatotropes présentent des courants transitoires potassiques I_A et calciques de type T. Afin de soustraire la participation de ces courants dans la réponse, nous avons mesuré la valeur

Figure 9: Dépolarisation membranaire induite par l'éjection de cpt-AMPc ou de GH-RH dans une cellule somatotrope active

Le potentiel membranaire est enregistré en courant imposé durant 3 min. consécutives.

- A** GH-RH 100 nM est appliqué par éjection par pression à et pour le temps indiqué par les échelles horizontales. Le potentiel de repos avant l'éjection de GH-RH était de -60 mV (ligne fine) (patch perforé)
- B** cpt-AMPc 0,5 mM est appliqué par éjection par pression à et pour le temps indiqué par les échelles horizontales. Le potentiel de repos avant l'éjection de cpt-AMPc était de -56 mV (ligne fine) (cellule entière)
- C** cpt-AMPc 0,5 mM est appliqué par éjection par pression à et pour le temps indiqué par les échelles horizontales. Le potentiel de repos avant l'éjection de cpt-AMPc était de -65 mV (ligne fine) (patch perforé).

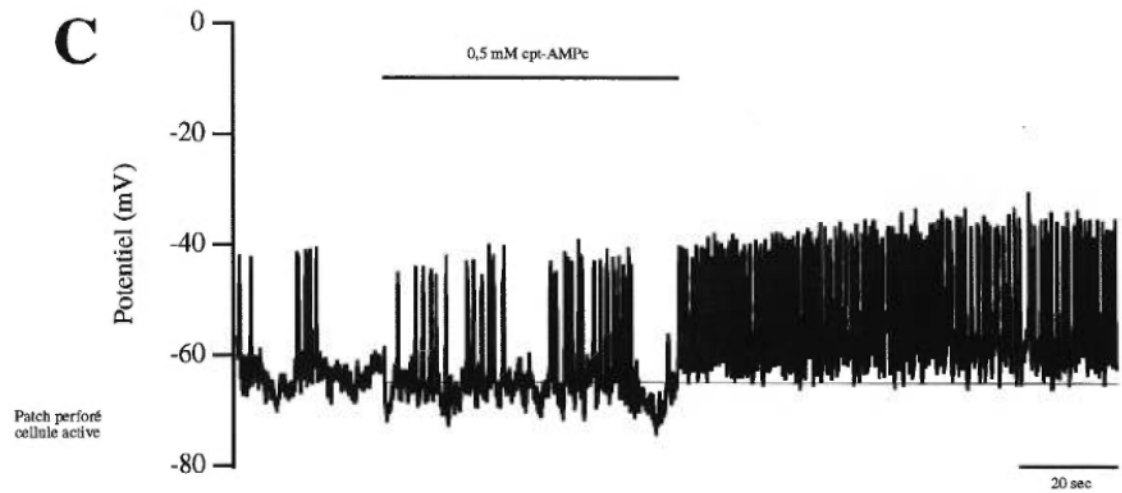
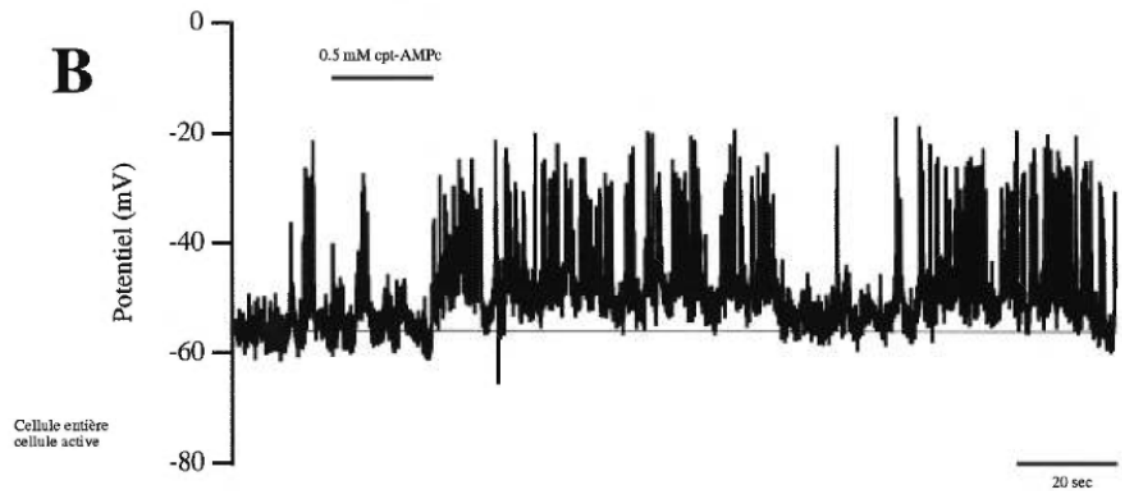
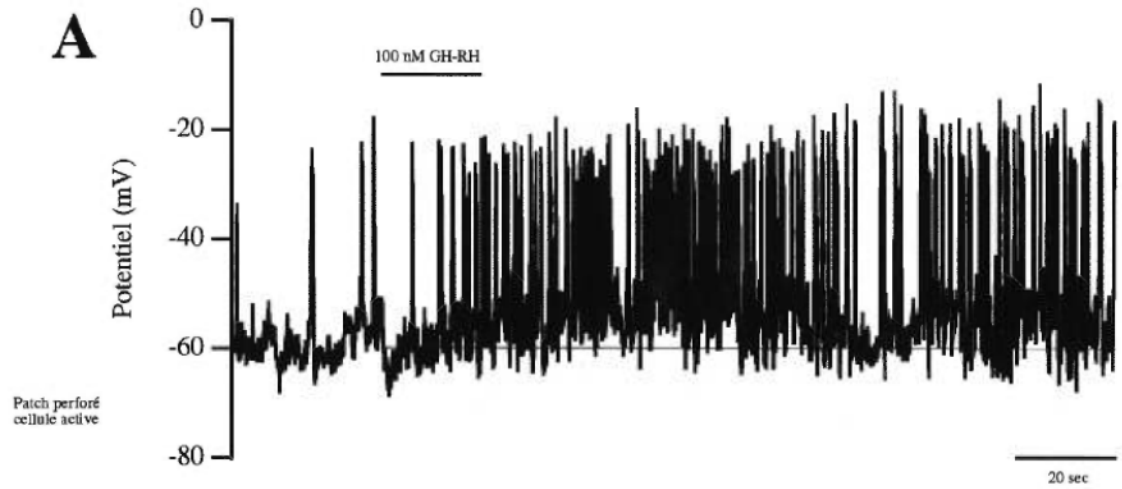


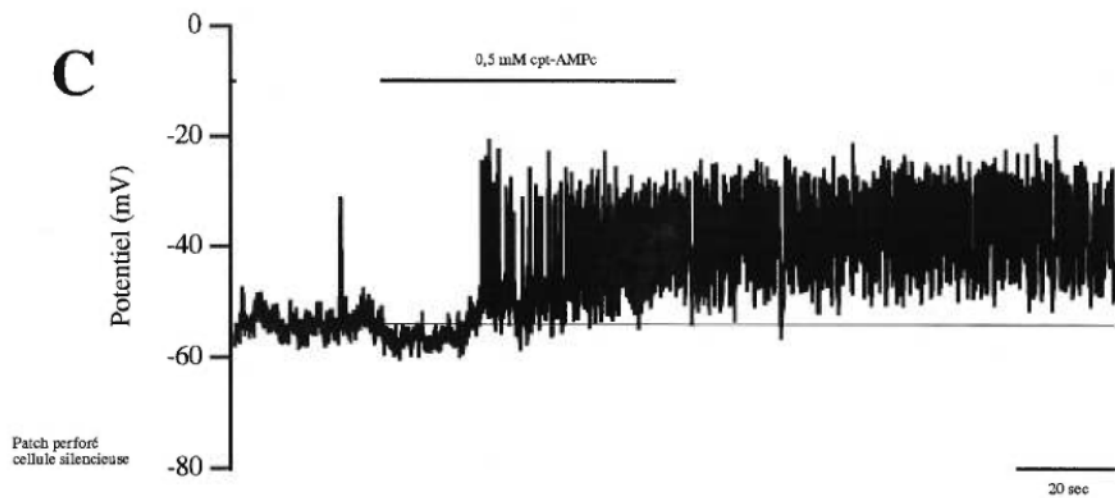
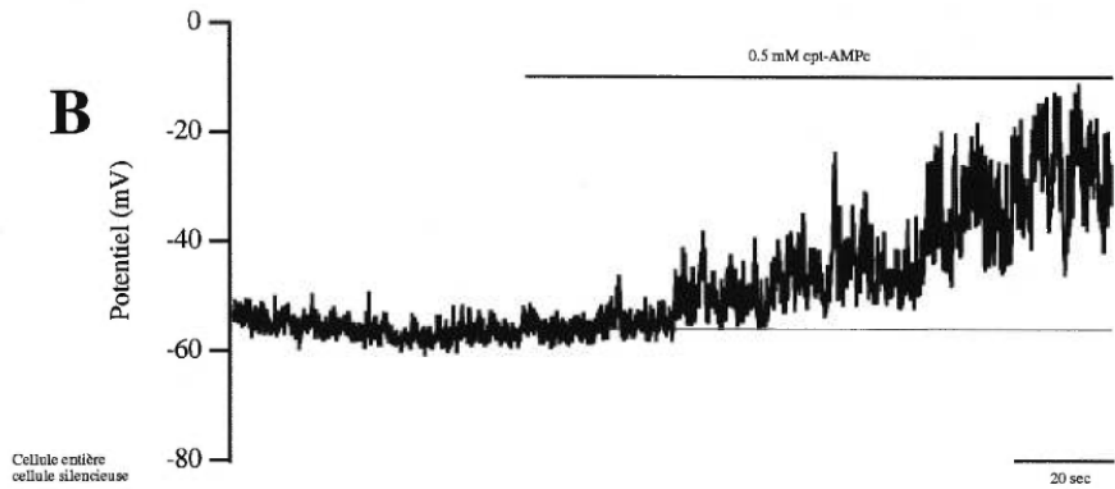
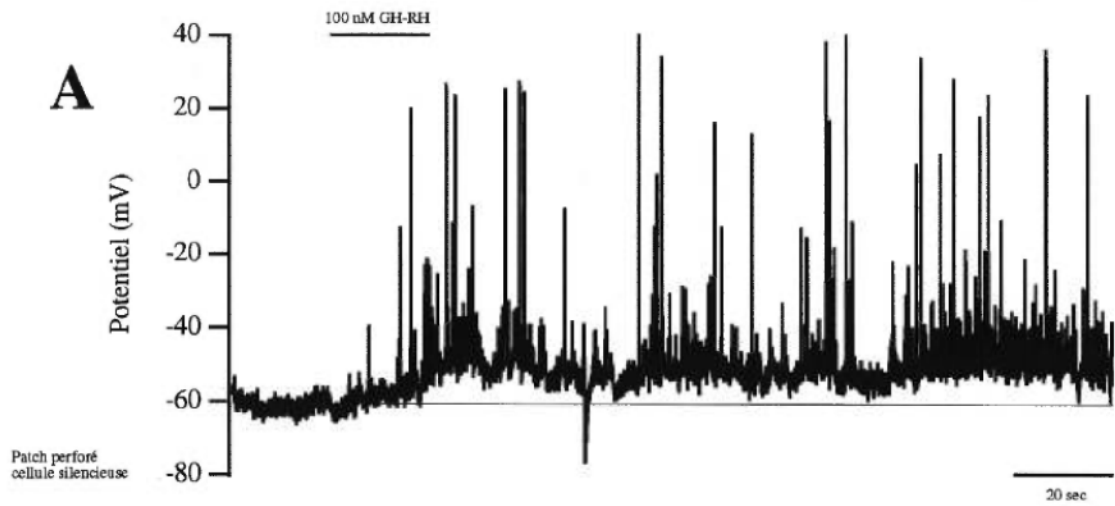
Figure 10: Dépolarisation membranaire induite par l'éjection de cpt-AMPC ou de GH-RH dans une cellule somatotrope silencieuse

Le potentiel membranaire est enregistré en courant imposé durant 3 min. consécutives.

- A** GH-RH 100 nM est appliqué par éjection par pression à et pour le temps indiqué par les échelles horizontales. Le potentiel de repos avant l'éjection de GH-RH était de -61 mV (ligne fine) (patch perforé)

- B** cpt-AMPC 0,5 mM est appliqué par éjection par pression à et pour le temps indiqué par les échelles horizontales. Le potentiel de repos avant l'éjection de cpt-AMPC était de -56 mV (ligne fine) (cellule entière)

- C** cpt-AMPC 0,5 mM est appliqué par éjection par pression à et pour le temps indiqué par les échelles horizontales. le potentiel de repos avant l'éjection de cpt-AMPC était de -54 mV (ligne fine) (patch perforé).



moyenne du courant sur la seconde moitié du saut. Puisque l'effet dépolarisant de la GH-RH est soutenu, il est légitime et même souhaitable d'éliminer les courants transitoires de l'étude. La courbe I/V a été construite en exprimant la valeur moyenne du courant pour chaque valeur de potentiel. Afin d'être en mesure de comparer la trace test et la trace témoin après correction pour la résistance de série, nous avons déterminé la valeur du courant à -90 et +15 mV par interpolation (ce qui suppose que la relation est linéaire entre les deux points utilisés, ce qui n'est pas nécessairement le cas). La seconde approche consiste à soumettre les cellules somatotropes à une rampe de potentiel continue de -100 à +20 mV, tout en mesurant le courant généré.

La Figure 11 présente l'allure générale de la relation I/V des cellules somatotropes selon les deux approches. Elle est caractérisée par un courant de fuite dans les potentiels négatifs, par un courant entrant entre -40 et -20 mV et, par un courant sortant aux potentiels supérieurs à -20 mV. Il arrive fréquemment que le courant entrant soit masqué par le courant sortant. En effet, l'amplitude du courant sortant est très nettement supérieure à l'amplitude du courant entrant. Dans le cadre de cette étude, nous avons obtenu un courant sortant moyen de 651 ± 30 pA (ce courant a été mesuré sur un ensemble de 181 cellules en milieu HBSS- $2Ca^{2+}$), dont plus de 10% présentaient un courant sortant supérieur à 1 nA.

La superposition des relations I/V (après correction pour la résistance de série) mesurées sur une même cellule témoigne de la validité des deux approches (Figure 12).

Nous avons mesuré la relation I/V au terme d'une éjection de 2 min. de cpt-AMPC 0,5 mM en cellule entière en sauts de potentiel et en rampe de potentiel. Les effets du cpt-AMPC sur le courant sortant sont similaires d'un protocole à l'autre (Figure 13). Cependant, la rampe semble être un outil plus sensible pour mesurer de faibles variations de courant. En effet, nous avons mesuré une diminution significative du courant entrant dans les cellules testées avec les rampes de potentiel (n=16) alors que cette diminution n'a pas été observée en sauts de

Figure 11: Courants ioniques totaux enregistrés en patch perforé.

Le potentiel de maintien est de -60 mV.

- A** La cellule est assujettie à des sauts de potentiel croissants de 10 mV, de -100 à +20 mV, d'une durée de 500 ms (à gauche). Le courant moyen durant la seconde moitié de chaque saut est exprimé en fonction du potentiel membranaire (à droite). Les trois principaux courants exprimés par les cellules somatotropes sont indiqués: le courant de fuite à gauche, le courant entrant au centre et le courant sortant à droite.
- B** La cellule est assujettie à une rampe de potentiel continue de -100 à +20 mV à un taux de 120 mV/s (à gauche). Les trois principaux courants exprimés par les cellules somatotropes sont indiqués: le courant de fuite à gauche, le courant entrant au centre et le courant sortant à droite (à droite).

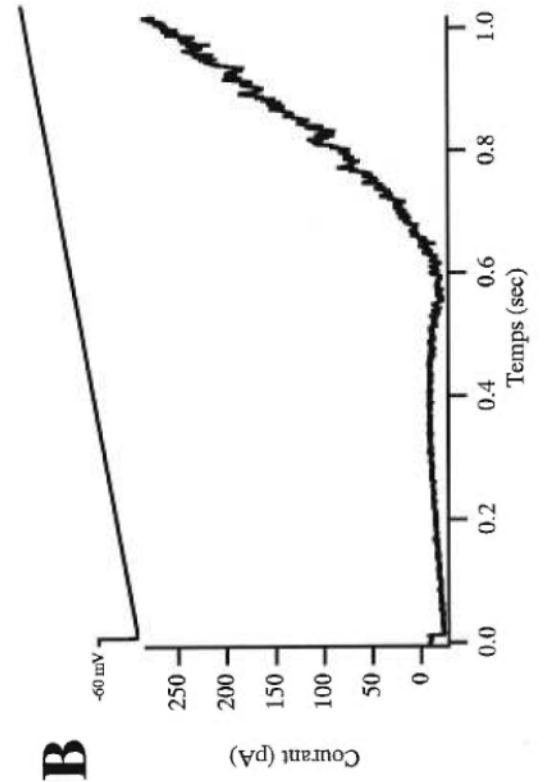
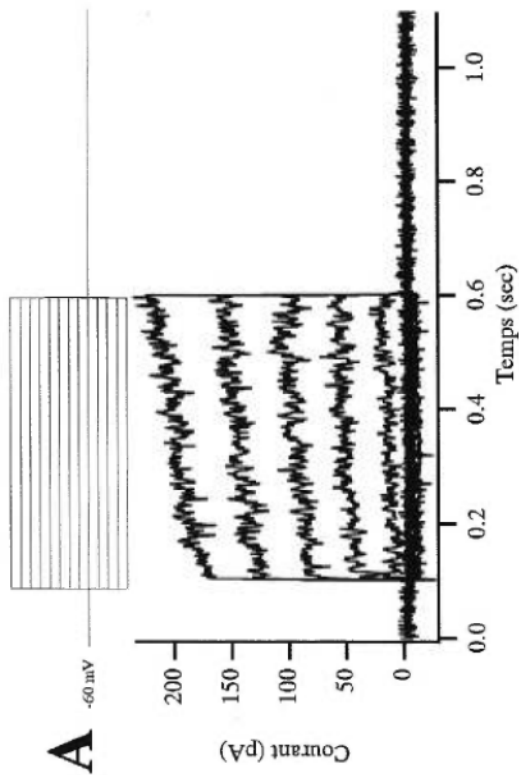
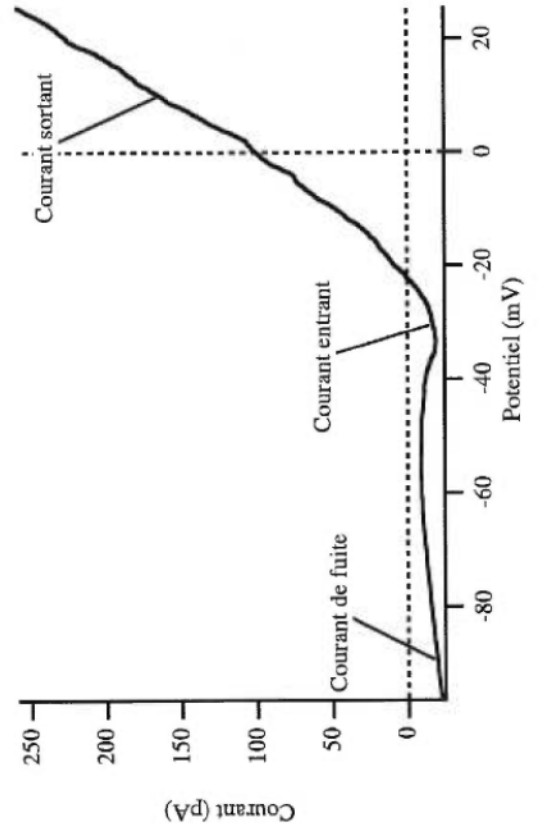
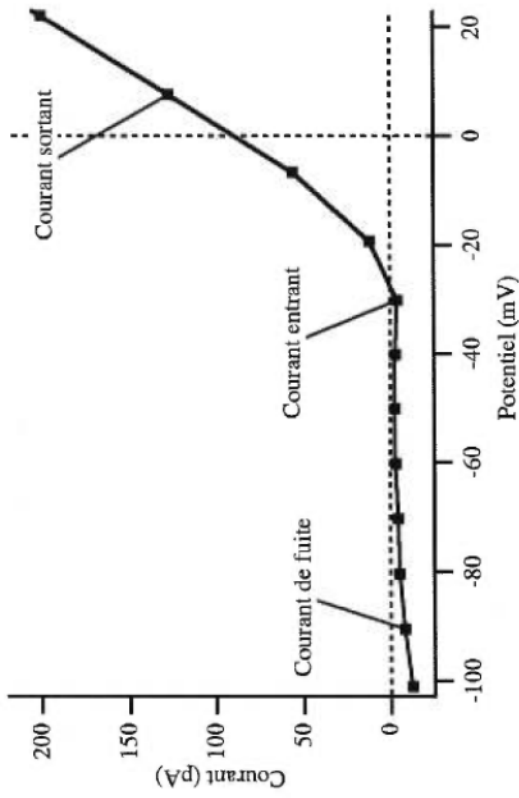


Figure 12: Superposition des courbes I/V mesurées par sauts et par rampe de potentiel sur une même cellule en milieu normal.

Le potentiel de maintien était de -60m mV.

La cellule est assujettie à une rampe de potentiel continue de -100 à +20 mV à un taux de 120 mV/s, puis à des sauts de potentiel croissants de 10 mV, de -100 à +20 mV, d'une durée de 500 ms.

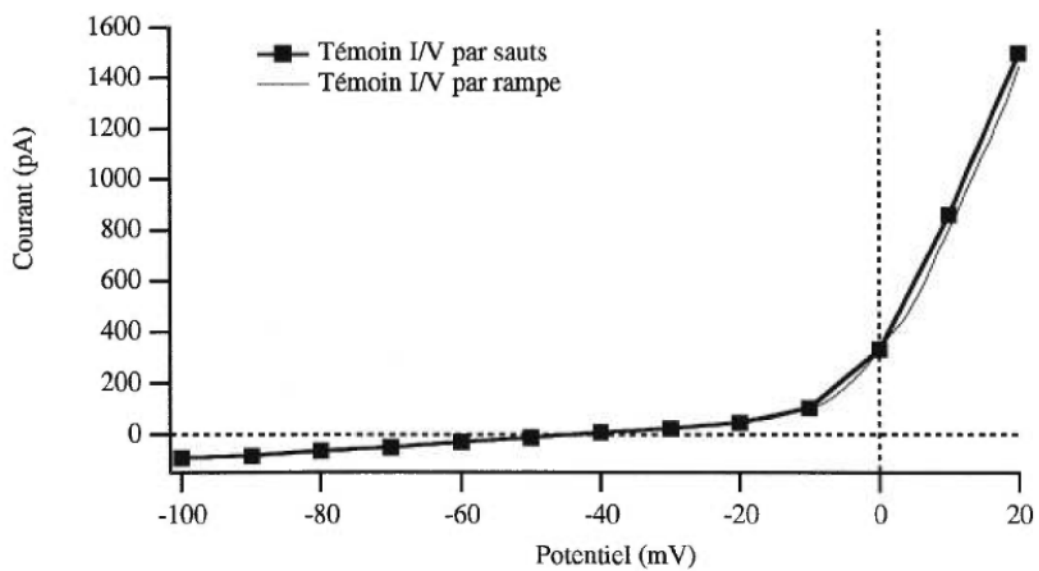
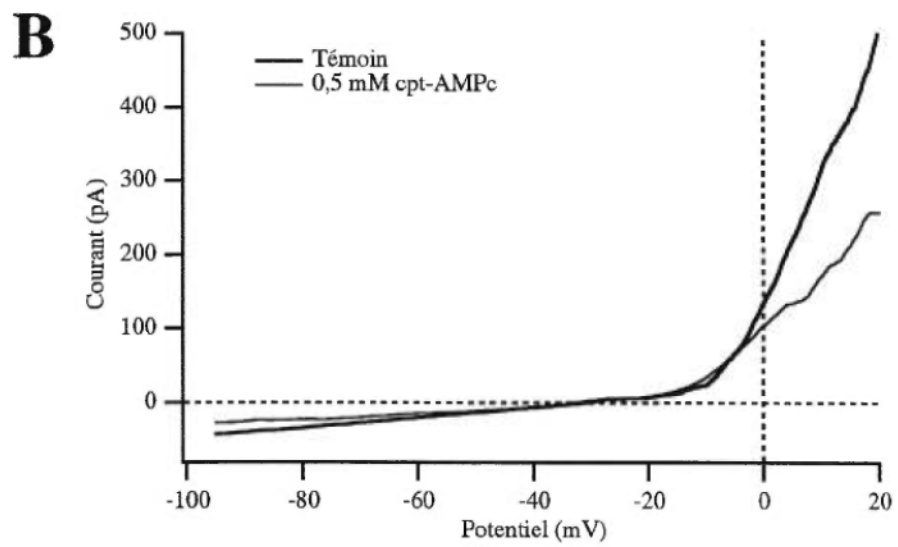
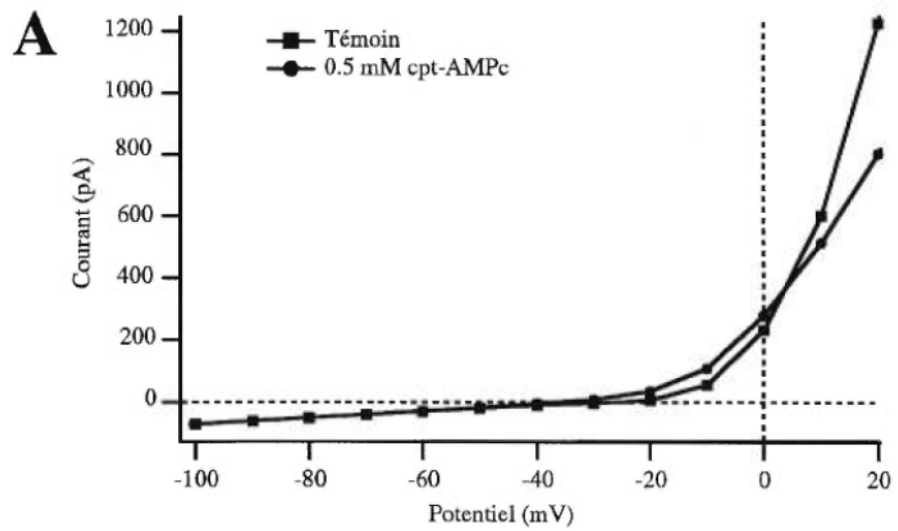


Figure 13: Modulation des courants totaux par le cpt-AMPC en cellule entière en sauts et en rampe de potentiel.

Le potentiel de maintien est de -60 mV.

- A** La cellule est assujettie à des sauts de potentiel croissants de 10 mV, de -100 à +20 mV, d'une durée de 500 ms. Le courant moyen durant la seconde moitié de chaque saut est exprimé en fonction du potentiel membranaire. Une éjection de 2 min. de cpt-AMPC 0,5 mM diminue le courant sortant (cercles pleins) par rapport au témoin (carrés).
- B** La cellule est assujettie à une rampe de potentiel continue de -100 à +20 mV à un taux de 120 mV/s. Une éjection de 2 min. de cpt-AMPC 0,5 mM diminue le courant sortant et le courant entrant (trait fin) par rapport au témoin (trait épais).



potentiel (n=8). Selon Naumov *et al.* (1994), les variations de courants à l'origine de la dépolarisation membranaire induite par la GH-RH sont très faibles, de l'ordre de quelques pA. Nous avons donc choisi d'utiliser les rampes de potentiel pour mener à terme cette étude.

4.3.2 Le potentiel de repos des cellules somatotropes

La relation I/V nous permet de déterminer le potentiel d'inversion de la membrane. Ce point particulier correspond à l'inversion du flux ionique (ou plus simplement à la valeur du potentiel de repos de la cellule). En deçà de cette valeur, le courant est entrant (entrée de cations du milieu extracellulaire vers le cytosol); au delà de celle-ci, le courant est sortant (sortie de cations du cytosol vers le milieu extracellulaire). Le potentiel d'inversion dans les cellules testées est de l'ordre de -22 ± 1 mV en configuration patch perforé (n=135) et de -20 ± 2 mV en configuration cellule entière (n=58).

4.3.3 Validation de l'utilisation d'un système d'éjection par pression

Afin de vérifier si l'éjection par pression ne modifie pas les propriétés électriques de la membrane des cellules somatotropes, nous avons évalué la relation I/V avant et suivant l'éjection de HBSS-2Ca²⁺ par une rampe de potentiel. Une éjection de 2 min. d'HBSS-2Ca²⁺ n'a d'effet ni sur les courants entrants ni sur les courants sortants (n=11) (Figure 14). Ces résultats indiquent que la pression appliquée dans l'environnement immédiat des cellules somatotropes ne perturbe pas la membrane; toutes les variations de courants mesurées sont donc imputables à l'activité cellulaire basale, à la GH-RH, aux analogues de l'AMPC ou aux milieux extracellulaires modifiés.

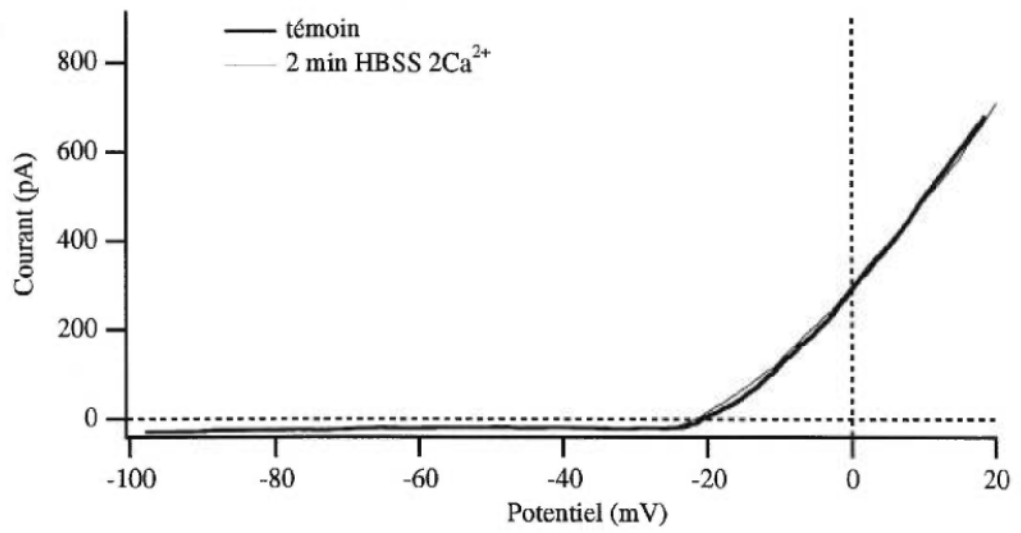
Résumé

D'une manière générale, les relations I/V obtenues par sauts et rampe de potentiel sont équivalentes. Toutefois, la rampe semble être un outil plus sensible

Figure 14: Relation I/V avant et suivant une éjection de milieu HBSS $2Ca^{2+}$.

Le potentiel de maintien est de -60 mV. Le potentiel membranaire varie de -100 à +20 mV à un taux de 120 mV/s.

La courbe I/V témoin et la courbe I/V après une éjection continue de 2 min. de milieu HBSS $2Ca^{2+}$ sont superposées.



pour mesurer de faibles variations de courants. La relation I/V nous permet en outre de déterminer la voltage-dépendance de certains courants, mais également de mesurer le potentiel de repos.

Le système d'éjection utilisé est adéquat pour l'étude des modulations des courants ioniques induit par le cpt-AMPC et la GH-RH, puisque la pression appliquée ne perturbe pas les propriétés électriques de la membrane des cellules somatotropes.

4.4 Effets du cpt-AMPC et de la GH-RH sur les courants ioniques totaux

La dépolarisation membranaire observée lors des enregistrements en courant imposé suggère la modulation de certaines conductances ioniques par la GH-RH et le cpt-AMPC. Afin de tester cette hypothèse et de déterminer quels sont les conductances modulées, nous avons évalué les effets du cpt-AMPC et de la GH-RH sur les courants ioniques totaux.

4.4.1 Le courant de fuite

Afin d'évaluer les effets du cpt-AMPC et de la GH-RH sur le courant de fuite dans les potentiels négatifs, nous avons soumis les cellules somatotropes à une éjection continue de cpt-AMPC 0,5 mM ou de GH-RH 100 nM. La relation I/V a été mesurée durant l'éjection au terme de 2 min.

Le cpt-AMPC diminue le courant de fuite par rapport au témoin. Ceci a été observé tant en configuration cellule entière (n=16) qu'en configuration patch perforé (n=24). Cette diminution est de l'ordre de $20 \pm 7\%$ et de $6 \pm 6\%$ respectivement (Figure 15).

La GH-RH n'a pas d'effet sur le courant de fuite (n=28). En effet l'amplitude du courant de fuite ne varie pas suivant l'éjection de GH-RH 100 nM par rapport au témoin (n=28) (Figure 15).

Figure 15: Modulation du courant de fuite par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à -90 mV

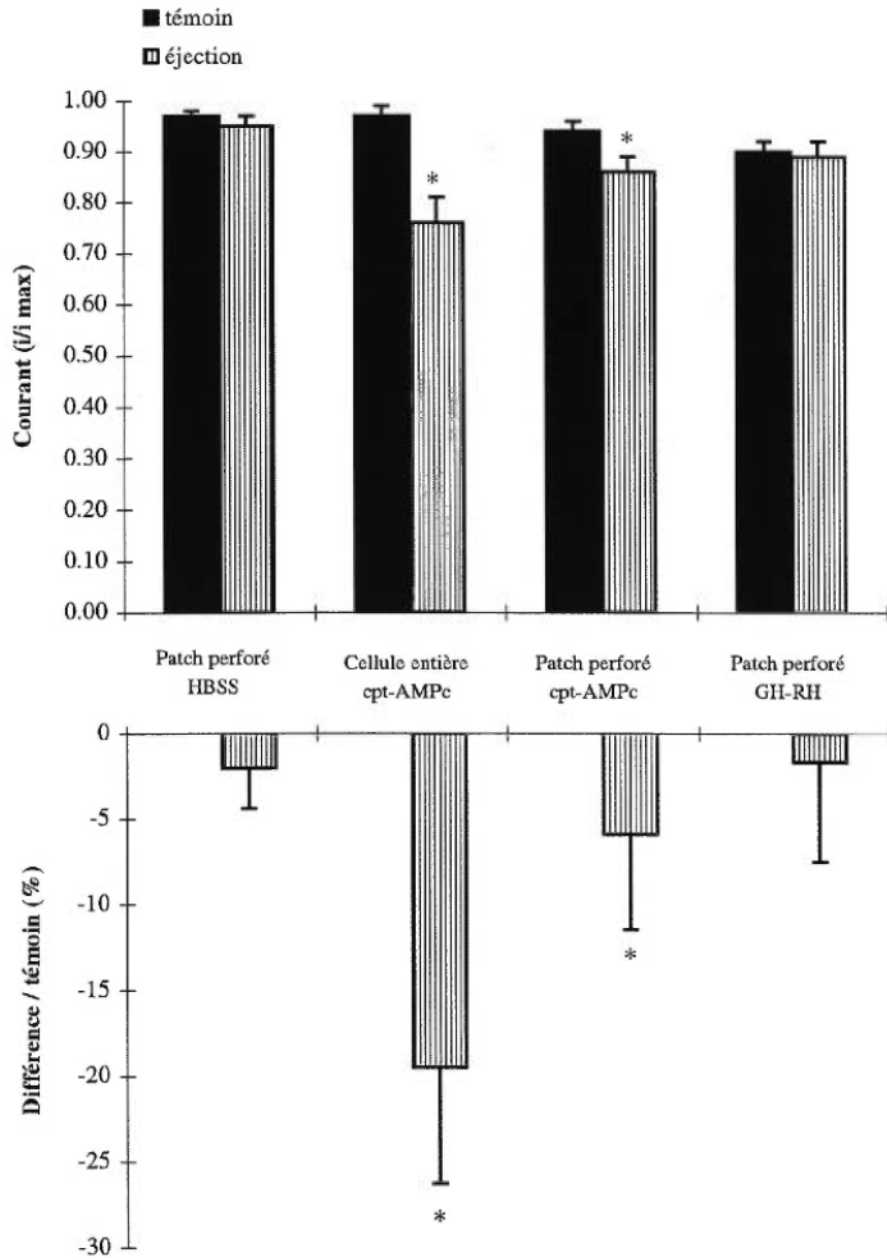
Un astérisque (*) indique les variations significatives par rapport au témoin.

Panneau supérieur

Le courant de fuite est exprimé par la variable i/i max dans la situation témoin (HBSS $2Ca^{2+}$), suivant une éjection continue de 2 min. de HBSS $2Ca^{2+}$, cpt-AMPC 0,5 mM (cellule entière et patch perforé) ou GH-RH 100 nM (patch perforé).

Panneau inférieur

Les variations du courant de fuite sont exprimées en pourcentages par rapport au témoin.



Ces résultats semblent indiquer que le cpt-AMPC inhibe partiellement un courant de fuite à -90 mV. La GH-RH ne semble toutefois ne pas avoir d'effet sur le courant de fuite total.

4.4.2 Le courant sortant

Afin d'évaluer les effets du cpt-AMPC et de la GH-RH sur le courant sortant total, nous avons soumis les cellules somatotropes à une éjection de 2 min. de cpt-AMPC 0,5 mM ou de GH-RH 100 nM. La relation I/V a été mesurée durant l'éjection au terme de 2 min..

Le cpt-AMPC diminue le courant sortant par rapport au témoin. Ceci a été observé en configuration cellule entière (n=16) et en configuration patch perforé (n=24). La diminution moyenne est de $30 \pm 5\%$ et $7 \pm 3\%$ respectivement (Figure 16).

La GH-RH ne semble pas affecter le courant sortant total. L'amplitude du courant n'est pas statistiquement différente entre la situation témoin et suivant une éjection de 2 min. de GH-RH (n=28) (Figure 16).

Ces résultats suggèrent que le cpt-AMPC inhibe partiellement un courant sortant dans les potentiels positifs. La GH-RH ne semble toutefois pas avoir d'effet sur le courant total.

Résumé

Le cpt-AMPC semble inhiber le courant de fuite et le courant sortant total des cellules somatotropes. La GH-RH, en revanche, ne semble pas avoir d'effet apparent sur les courants totaux (courant de fuite et courant sortant).

4.5 Identification des courants modulés par le cpt-AMPC et la GH-RH

Afin de vérifier quels sont les courants modulés par le cpt-AMPC et de vérifier si la GH-RH n'affecte pas certains courants qui pourraient être masqués par

Figure 16: Modulation du courant sortant par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à +15 mV

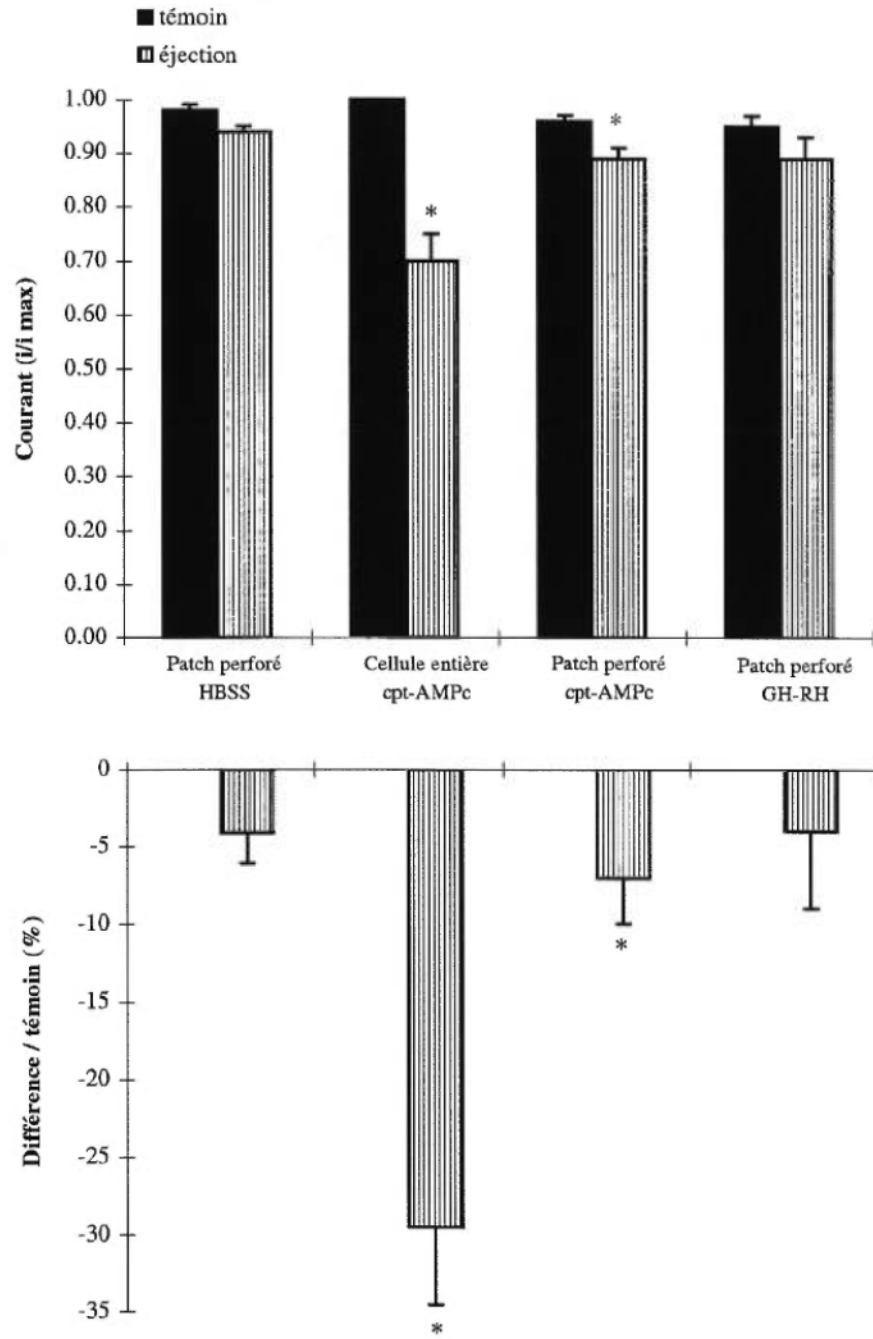
Un astérisque (*) indique les variations significatives par rapport au témoin.

Panneau supérieur

Le courant sortant est exprimé par la variable i/i_{max} dans la situation témoin (HBSS 2Ca^{2+}), suivant une éjection continue de 2 min. de HBSS 2Ca^{2+} , cpt-AMPC 0,5 mM (cellule entière et patch perforé) ou GH-RH 100 nM (patch perforé).

Panneau inférieur

Les variations du courant sortant sont exprimées en pourcentages par rapport au témoin.



les courants totaux, nous avons évalué les effets de ces derniers en soumettant les cellules somatotropes à des milieux extracellulaires modifiés (appauvrissement en certains ions et utilisations de différents antagonistes des canaux ioniques).

4.5.1 Courant de fuite

4.5.1.1 Caractérisation du courant de fuite dans les cellules somatotropes

Milieu contenant un inhibiteur des canaux potassiques (HBSS-TEAb)

Afin de vérifier quelle est l'importance de la fuite potassique dans les cellules somatotropes, nous avons mesuré la relation I/V par rampe de potentiel continue dans chacune des conditions suivantes:

- les cellules placées dans un milieu normal HBSS-2Ca²⁺
- à la fin de 15 sec. éjection de HBSS-TEAb (5,7 mM)
- après une période de repos d'1 min.

Le courant de fuite suivant l'éjection de TEA diminue par rapport au témoin. Cette diminution est de l'ordre de $11 \pm 9\%$ en configuration cellule entière (n=12) et de $22 \pm 3\%$ en configuration patch perforé (n=23). Ces résultats suggèrent qu'environ 10 à 20% de la fuite exprimée par les cellules somatotropes est une conductance potassique.

Milieu appauvri en calcium (HBSS-0Ca)

Afin de vérifier si une partie du courant de fuite exprimé par les cellules somatotropes est calcium-dépendant, nous avons mesuré la relation I/V par rampe de potentiel continue dans chacune des conditions suivantes:

- les cellules placées dans un milieu normal HBSS-2Ca²⁺
- à la fin de 15 sec. éjection de HBSS-0Ca²⁺
- après une période de repos d'1 min.

Le courant de fuite suivant le retrait des ions Ca^{2+} augmente par rapport au témoin. Cette augmentation est de l'ordre de $24 \pm 9\%$ ($n=14$) en configuration cellule entière et de $78 \pm 16\%$ en configuration patch perforé ($n=23$). L'amplitude du courant de fuite revient à sa valeur initiale après une période de repos d'une min.. Ceci suggère qu'une partie de la fuite est calcium-dépendante.

4.5.1.2 Courants de fuite modulés par le cpt-AMPC et la GH-RH

Milieu contenant un inhibiteur des canaux potassiques (HBSS-TEAb)

Afin d'évaluer l'effet du cpt-AMPC et de la GH-RH sur les fuites sodiques et calciques, nous avons mesuré la relation I/V des cellules somatotropes en présence d'un inhibiteur des canaux potassiques (TEA 5,7 mM). Les relations I/V ont été mesurées dans chacune des conditions suivantes durant l'éjection au terme de la durée indiquée:

- les cellules placées dans un milieu normal HBSS- 2Ca^{2+}
- à la fin de 15 sec. éjection de HBSS-TEAb
- après 1 min. de repos suivant l'éjection
- à la fin de 2 min. d'éjection de cpt-AMPC 0,5 mM ou GH-RH 100 nM
- à la fin de 15 sec. d'éjection de HBSS-TEAb

L'éjection de cpt-AMPC 0,5 mM + TEA n'affecte pas le courant de fuite de manière significative par rapport à une éjection seule de TEA. Ceci a été observé tant en cellule entière ($n=12$) qu'en patch perforé ($n=8$). En revanche, l'éjection de GH-RH 100 nM + TEA augmente le courant de fuite par rapport à une éjection seule de TEA. Cette augmentation est de l'ordre de $13 \pm 5\%$ ($n=13$) (Figure 17). Ces résultats suggèrent que le courant inhibé par le cpt-AMPC est TEA-sensible, et que la GH-RH activerait un courant TEA-insensible.

Figure 17: Modulation du courant de fuite par la GH-RH mesuré à -90 mV en présence de TEA

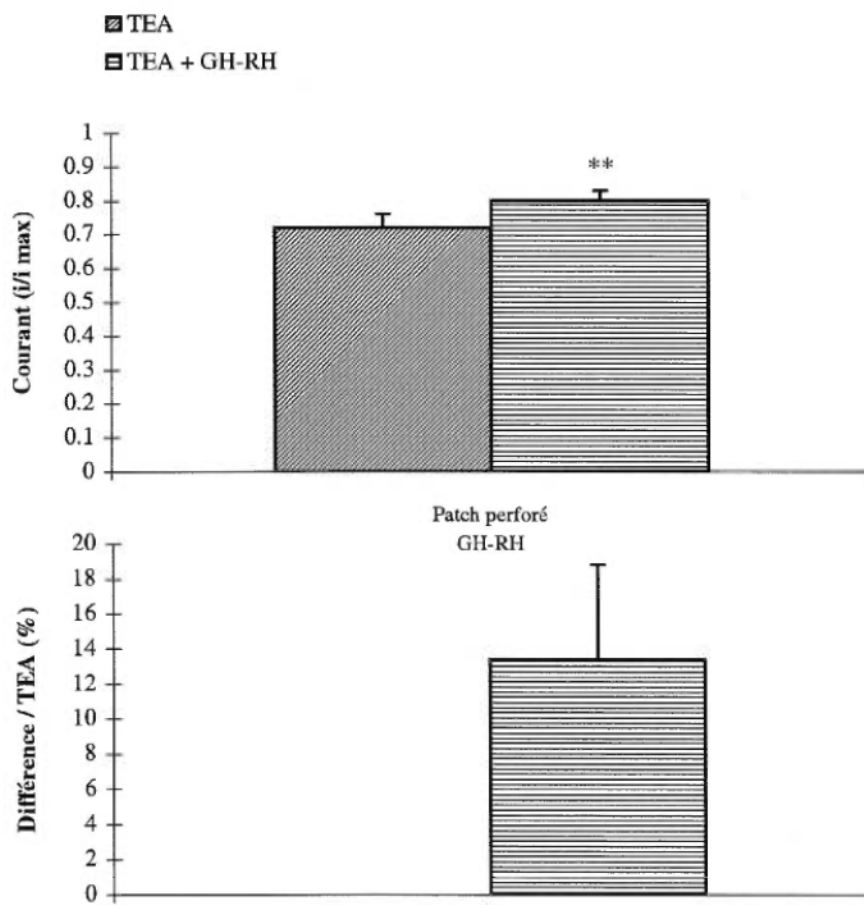
Un double astérisque (**) indique la variation significative par rapport au TEA seul.

Panneau supérieur

Le courant de fuite est exprimé par la variable i/i max suivant une éjection continue de 15 sec. de 5,7 mM TEA, et suivant une éjection de 15 sec de 5,7 mM TEA en présence de GH-RH 100 nM (patch perforé).

Panneau inférieur

La variation du courant de fuite est exprimée en pourcentages par rapport au TEA.



Milieu appauvri en calcium et contenant un antagoniste des canaux potassiques (HBSS-0Ca + TEA)

Afin d'isoler la fuite sodique, nous avons mesuré la relation I/V par rampe de potentiel continue en soumettant les cellules somatotropes à un milieu extracellulaire appauvri en ions calcium et contenant un inhibiteur des canaux potassiques. Les relations I/V ont été mesurées dans chacune des conditions suivantes durant l'éjection au terme de la durée indiquée:

- les cellules placées dans un milieu normal HBSS-2Ca²⁺
- à la fin de 15 sec. d'éjection de HBSS-0Ca²⁺ + TEA (10 mM)
- après 1 min. de repos suivant l'éjection
- à la fin de 2 min. d'éjection de cpt-AMPC 0,5 mM ou GH-RH 100 nM
- à la fin de 15 sec. d'éjection de HBSS-0Ca²⁺ + TEA

L'éjection de milieu 0Ca²⁺ + TEA dans l'environnement immédiat des cellules somatotropes augmente le courant de fuite par rapport au témoin. Ceci a été observé tant en configuration cellule entière (n=13) qu'en configuration patch perforé (n=15). Cette augmentation est de l'ordre de $21 \pm 4\%$ et de $32 \pm 9\%$ † respectivement († Cette valeur correspond à la variation du courant de fuite observée dans les cellules qui ont été testées avec le cpt-AMPC (n=8) ou avec la GH-RH (n=7) en patch perforé).

Le cpt-AMPC diminue le courant de fuite par rapport au témoin. Ceci a été observé tant en configuration cellule entière (n=13) qu'en configuration patch perforé (n=8). La diminution est de l'ordre de $7 \pm 8\%$ et de $17 \pm 7\%$ respectivement. Ces diminutions sont similaires à celles que nous avons observées lors de l'éjection de cpt-AMPC en milieu HBSS-2Ca²⁺ sans autre traitement préalable (cf. 4.4.1). En effet, la valeur du courant de fuite 1 min. suivant l'éjection de 0Ca²⁺ + TEA est différente de celle du témoin ($+12 \pm 10\%$ en configuration cellule entière et $-9 \pm 5\%$ en configuration patch perforé). La GH-RH n'affecte pas le courant de fuite par rapport au témoin (n=7) (Figure 18).

Figure 18: Modulation du courant de fuite par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à -90 mV en présence de 0Ca + TEA.

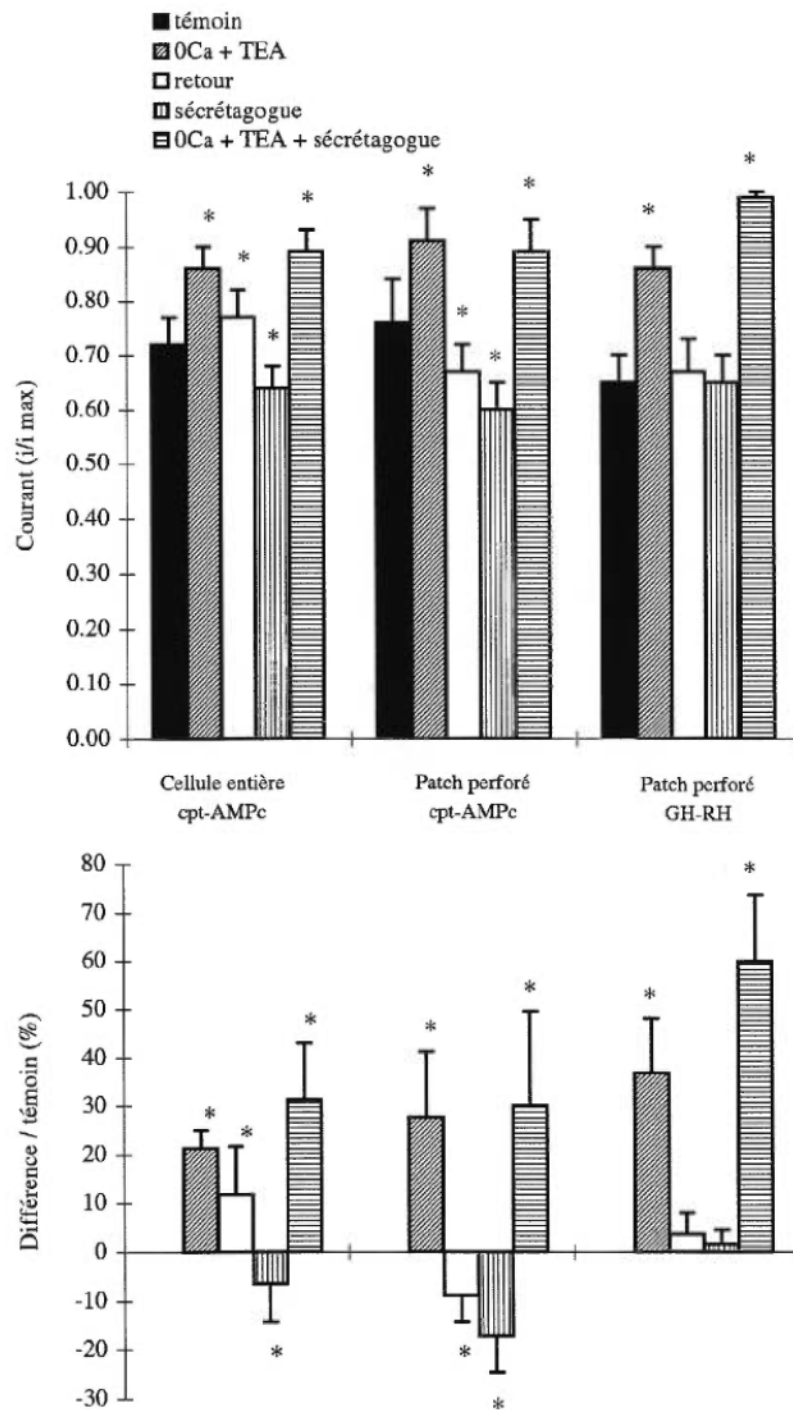
Un astérisque (*) indique les variations significatives par rapport au témoin.

Panneau supérieur

Le courant de fuite est exprimé par la variable i/i max dans la situation témoin (HBSS $2Ca^{2+}$), suivant une éjection continue de 15 sec. de 0Ca + 10 mM TEA et une éjection continue de 2 min. de cpt-AMPC 0,5 mM (cellule entière et patch perforé) ou GH-RH 100 nM (patch perforé).

Panneau inférieur

Les variations du courant de fuite sont exprimées en pourcentages par rapport au témoin.



Le courant de fuite suivant l'éjection de 0Ca^{2+} + TEA + cpt-AMPC 0,5 mM n'est pas statistiquement différent du courant de fuite suivant l'éjection seule de 0Ca^{2+} + TEA (configuration cellule entière et patch perforé). Ceci suggère que le cpt-AMPC n'affecte pas la fuite sodique (Figure 18). Cependant, l'éjection de 0Ca^{2+} + TEA suivant l'éjection de GH-RH augmente l'amplitude de la fuite par rapport à une éjection seule de 0Ca^{2+} + TEA ($37 \pm 11\%$ vs $60 \pm 14\%$) (Figure 18). Ceci semble indiquer que la GH-RH active un courant de fuite sodique dans les potentiels négatifs.

Milieu appauvri en sodium et contenant un antagoniste des canaux potassiques (HBSS-0Na + TEA)

Afin de vérifier si le cpt-AMPC ou la GH-RH module un autre courant dans les potentiels négatifs outre les fuites sodique et potassique, nous avons mesuré la relation I/V par rampe de potentiel dans chacune des conditions suivantes:

- les cellules placées dans un milieu normal HBSS-TEAa (22 mM)
- à la fin de 15 sec. d'éjection de HBSS-0Na⁺ + TEAa
- à la fin de 2 min. d'éjection de cpt-AMPC 0,5 mM ou GH-RH 100 nM + TEAa
- à la fin de 15 sec. d'éjection de HBSS-0Na⁺ + TEAa

La solution intracellulaire d'enregistrement contenait des ions césium qui possèdent la propriété de bloquer les canaux potassiques à partir de la face intracellulaire de la membrane. Les courants de fuite ont une amplitude relativement faible; l'utilisation combinée de deux antagonistes des canaux potassiques optimisent la sensibilité des mesures.

L'application de 0Na^{+} + TEA dans l'environnement immédiat des cellules somatotropes diminue le courant entrant de $27 \pm 2\%$ (n=24) par rapport au témoin (TEA). Cette diminution moyenne a été calculée sur l'ensemble des cellules testées avec le cpt-AMPC (n=14) ou la GH-RH (n=10) (Figure 19) en configuration patch perforé. Ceci suggère que le quart de la fuite TEA-insensible est sodique.

Figure 19: Modulation du courant de fuite par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à -90 mV en présence de 0Na + TEA.

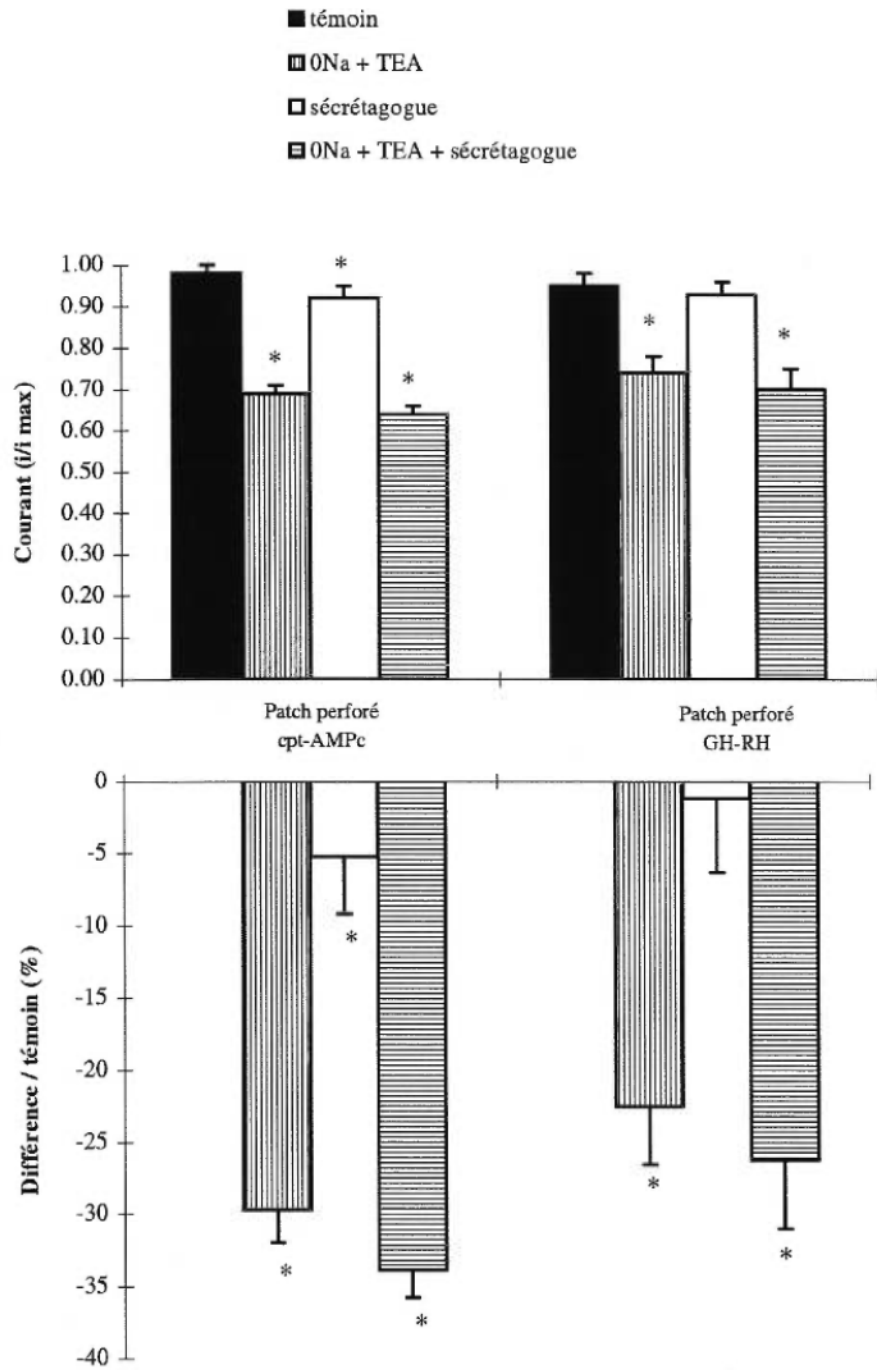
Un astérisque (*) indique les variations significatives par rapport au témoin.

Panneau supérieur

Le courant de fuite est exprimé par la variable i/i max dans la situation témoin (22 mM TEA), suivant une éjection continue de 15 sec. de 0Na + 22 mM TEA et une éjection continue de 2 min. de cpt-AMPC 0,5 mM (patch perforé) ou GH-RH 100 nM (patch perforé).

Panneau inférieur

Les variations du courant de fuite sont exprimées en pourcentages par rapport au témoin.



Le cpt-AMPC diminue le courant de fuite de $5 \pm 4\%$ par rapport à la situation témoin (TEA). De plus l'éjection de $0\text{Na} + \text{TEA} + \text{cpt-AMPC}$ ne modifie pas le courant de fuite par rapport à l'éjection seule de $0\text{Na} + \text{TEA}$.

La GH-RH n'a pas d'effet sur le courant de fuite en absence de sodium extracellulaire et en présence d'antagoniste des canaux potassiques. (Figure 19). Ces résultats suggèrent que le cpt-AMPC semble moduler un courant différent de la fuite sodique et de la fuite TEA-sensible, et la GH-RH n'agirait que sur la fuite sodique.

Résumé

Le courant de fuite des cellules somatotropes comprend notamment un courant potassique, un courant sodique et un courant calcium-dépendant.

En regard des résultats présentés, le cpt-AMPC inhiberait un courant de fuite TEA-sensible et un courant de fuite TEA-insensible, et la GH-RH activerait un courant de fuite sodique.

4.5.2 Le courant sortant

Milieu contenant un antagoniste des canaux potassiques (HBSS-TEb)

Afin de vérifier si le cpt-AMPC module un courant potassique dans les potentiels positifs, nous avons mesuré la relation I/V par rampe de potentiel continue dans chacune des conditions suivantes:

- les cellules placées dans un milieu normal HBSS- 2Ca^{2+}
- à la fin de 15 sec. d'éjection de HBSS-TEAb
- après 1 min. de repos suivant l'éjection
- à la fin de 2 min. d'éjection de cpt-AMPC 0,5 mM (ou GH-RH 100 nM)
- à la fin de 15 sec. d'éjection de HBSS-TEAb

Nous avons également testé les effets de la GH-RH sur le courant sortant dans ces conditions afin de nous assurer que la GH-RH ne module pas un courant masqué par les courants potassiques.

L'application de milieu TEA dans l'environnement immédiat des cellules somatotropes diminue le courant sortant par rapport au témoin. Ceci a été observé tant en configuration cellule entière (n=12) qu'en configuration patch perforé (n=21). La diminution moyenne est de $78 \pm 6\%$ et de $73 \pm 2\% \dagger$, respectivement (\dagger Cette valeur correspond à la variation du courant sortant observée dans les cellules qui ont été testées avec le cpt-AMPC (n=8) ou avec la GH-RH (n=13) en configuration patch perforé). La concentration de TEA utilisée lors de ces expériences était de 5,7 mM. Cette concentration est relativement faible et nous permet de dire que le courant potassique représente au moins 75% du courant sortant total exprimé par les cellules somatotropes.

Le cpt-AMPC diminue de $48 \pm 7\%$ le courant sortant en configuration cellule entière (n=12). En configuration patch perforé, la diminution du courant n'est pas significative (n=8) (Figure 20). La diminution du courant sortant par le cpt-AMPC en configuration cellule entière semble supérieure à la diminution observée lors de l'éjection de cpt-AMPC en milieu HBSS- $2Ca^{2+}$ sans autre traitement préalable (cf. 4.4.2). Cependant, l'amplitude du courant sortant total 1 min. suivant la première éjection de TEA est plus faible qu'elle n'était au début de l'expérience (diminution de $14 \pm 7\%$). La GH-RH n'affecte pas le courant sortant (n=13) confirmant les résultats obtenus précédemment (Figure 20).

La diminution du courant sortant induite par le TEA est similaire avant et suivant l'éjection de cpt-AMPC (configuration cellule entière et patch perforé) et de GH-RH (configuration patch perforé).

Ces résultats suggèrent que le cpt-AMPC inhibe un courant potassique. De plus la diminution induite par le cpt-AMPC étant inférieure à celle induite par le TEA, le courant potassique ne serait que partiellement inhibé par le cpt-AMPC.

Figure 20: Modulation du courant sortant par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à +15mV en présence de TEA

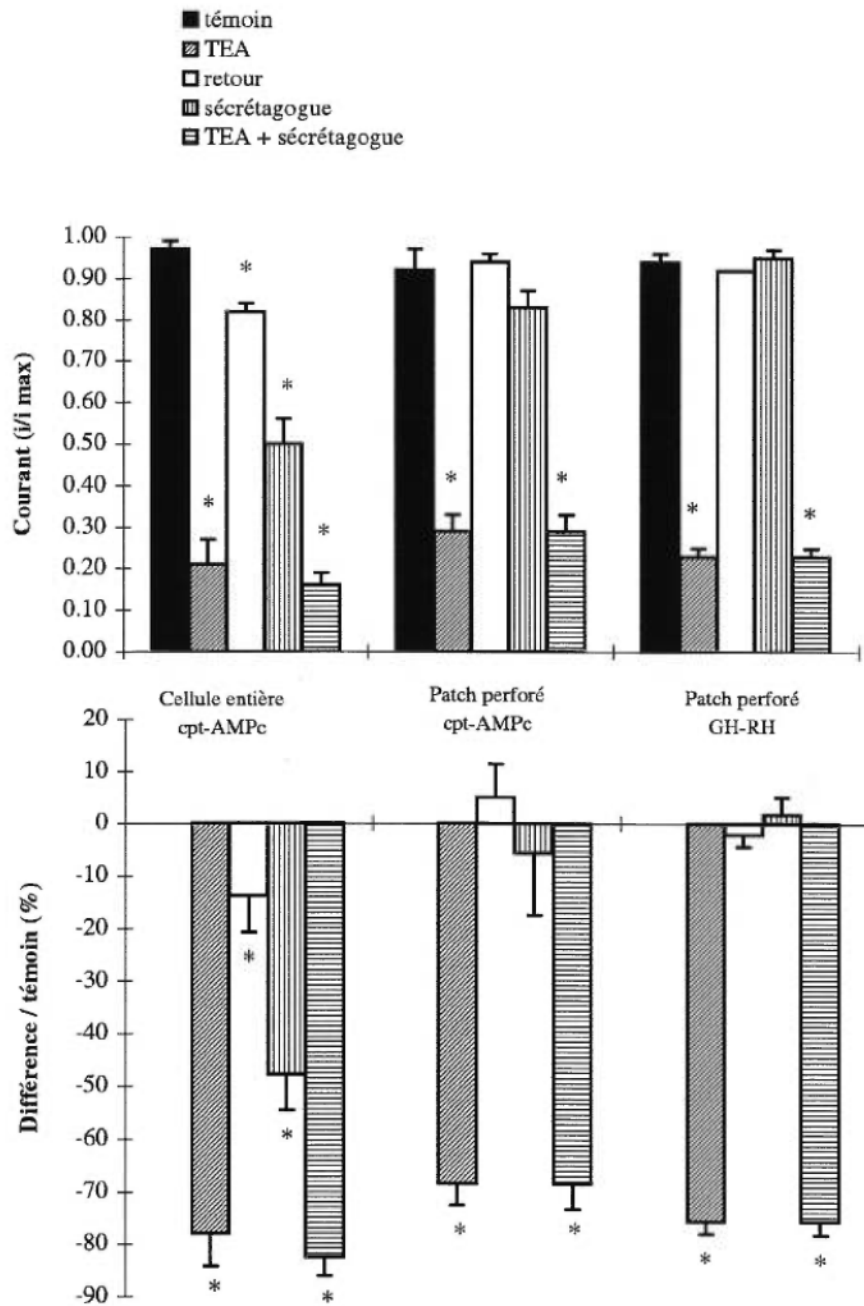
Un astérisque (*) indique les variations significatives par rapport au témoin.

Panneau supérieur

Le courant de fuite est exprimé par la variable i/i_{max} dans la situation témoin (HBSS 2Ca^{2+}), suivant une éjection continue de 15 sec. de 5,7 mM TEA et une éjection continue de cpt-AMPC 0,5 mM (cellule entière et patch perforé) ou GH-RH 100 nM (patch perforé).

Panneau inférieur

Les variations du courant de fuite sont exprimées en pourcentages par rapport au témoin.



Milieu appauvri en calcium (HBSS-0Ca)

Afin de vérifier si le courant potassique modulé par le cpt-AMPC dans les potentiels positifs est calcium-dépendant, nous avons mesuré la relation I/V par rampe de potentiel continue dans chacune des conditions suivantes:

- les cellules placées dans un milieu normal HBSS-2Ca²⁺
- à la fin de 15 sec. éjection de HBSS-0Ca²⁺
- après 1 min. de repos suivant l'éjection
- à la fin de 2 min. d'éjection de cpt-AMPC 0,5 mM (ou GH-RH 100 nM)
- à la fin de 15 sec. éjection de HBSS-0Ca²⁺

Nous avons également testé les effets du GH-RH sur le courant sortant dans ces conditions.

Le courant sortant est sensible au calcium. En effet, l'application de 0Ca²⁺ dans l'environnement immédiat des cellules somatotropes, induit une diminution du courant sortant par rapport au témoin. Ceci a été observé tant en configuration cellule entière (n=15) qu'en configuration patch perforé (n=23). La diminution moyenne est de l'ordre de 35 ± 4% et de 72 ± 5%†, respectivement († cette valeur réfère à la diminution moyenne observée sur les cellules testées avec le cpt-AMPC ou la GH-RH) (Figure 21). La diminution du courant est plus importante d'un facteur de 2 en patch perforé qu'en cellule entière.

Le cpt-AMPC diminue le courant sortant par rapport au témoin (Figure 21). La diminution moyenne est de l'ordre de 41 ± 7% en configuration cellule entière (n=15) et 9 ± 7% et en configuration patch perforé (n=13). Bien que la diminution du courant sortant induite par le cpt-AMPC semble être supérieure à la diminution observée lors de l'éjection de cpt-AMPC en milieu HBSS-2Ca²⁺ en absence de traitement préalable (cf 4.4.2), elles sont comparables. En effet, l'amplitude du courant total est plus faible 1 min. suivant l'éjection de 0Ca²⁺ qu'elle ne l'était au début de l'expérience (la diminution est de 11 ± 5% en cellule entière et de 6 ± 2% en patch perforé). Les effets d'un retrait du calcium extracellulaire sont réversibles, au moins partiellement.

Figure 21: Modulation du courant sortant par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à +15 mV en présence de $0Ca^{2+}$

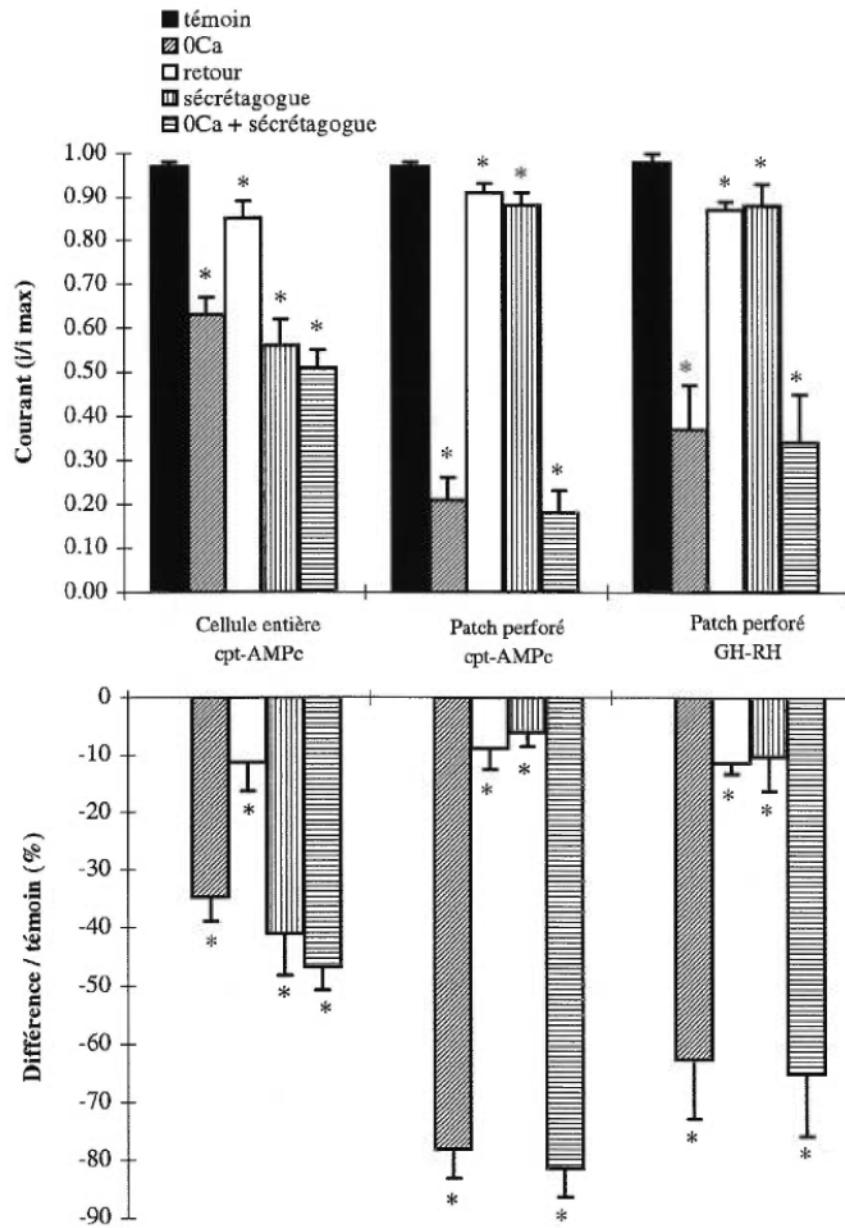
Un astérisque (*) indique les variations significatives par rapport au témoin.

Panneau supérieur

Le courant de fuite est exprimé par la variable i/i_{max} dans la situation témoin (HBSS $2Ca^{2+}$), suivant une éjection continue de 15 sec. de $0Ca$ et une éjection continue de 2 min. de cpt-AMPC 0,5 mM (cellule entière et patch perforé) ou GH-RH 100 nM (patch perforé).

Panneau inférieur

Les variations du courant de fuite sont exprimées en pourcentages par rapport au témoin.



La GH-RH diminue le courant sortant de $10 \pm 6\%$ ($n=10$) (Figure 21). Cette diminution peut également être attribuée aux effets prolongés du milieu HBSS- $0Ca^{2+}$, puisque l'amplitude du courant 1 min. suivant l'éjection de $0Ca^{2+}$ est plus faible que l'amplitude du témoin (diminution de $12 \pm 2\%$), et n'est pas différente de celle du courant suivant l'éjection de GH-RH (Figure 21).

La diminution du courant sortant induite par le $0Ca^{2+}$ est similaire avant et suivant l'éjection de cpt-AMPC (configuration cellule entière et patch perforé), et de GH-RH. Ces résultats suggèrent que le cpt-AMPC module un courant potassique calcium-dépendant (I_{KCa}).

Milieu appauvri en calcium et contenant un antagoniste des canaux potassiques (HBSS- $0Ca^{2+}$ + TEA)

Afin de vérifier si le cpt-AMPC module un autre courant dans les potentiels positifs outre un courant potassique calcium-dépendant, nous avons mesuré la relation I/V par rampe de potentiel continue dans chacune des conditions suivantes:

- les cellules placées dans un milieu normal HBSS- $2Ca^{2+}$
- à la fin de 15 sec. éjection de HBSS- $0Ca^{2+}$ + TEA (10 mM)
- après 1 min. de repos suivant l'éjection
- à la fin de 2 min. d'éjection de cpt-AMPC 0,5 mM (ou GH-RH 100 nM)
- à la fin de 15 sec. éjection de HBSS- $0Ca^{2+}$ + TEA

Nous avons également évalué les effets de la GH-RH sur le courant sortant dans ces conditions.

L'application de $0Ca^{2+}$ + TEA dans l'environnement immédiat des cellules somatotropes, diminue grandement le courant sortant par rapport au témoin. Ceci a été observé tant en configuration cellule entière ($n=13$) qu'en configuration patch perforé ($n=18$) (Figure 22). La diminution moyenne observée est de $89 \pm 2\%$ et de $86 \pm 1\%$ †, respectivement († cette valeur réfère à la diminution moyenne observée sur les cellules testées avec le cpt-AMPC ($n=9$) ou la GH-RH ($n=9$) en patch

Figure 22: Modulation du courant sortant par le cpt-AMPC et la GH-RH mesuré à +15 mV en présence de 0Ca + TEA

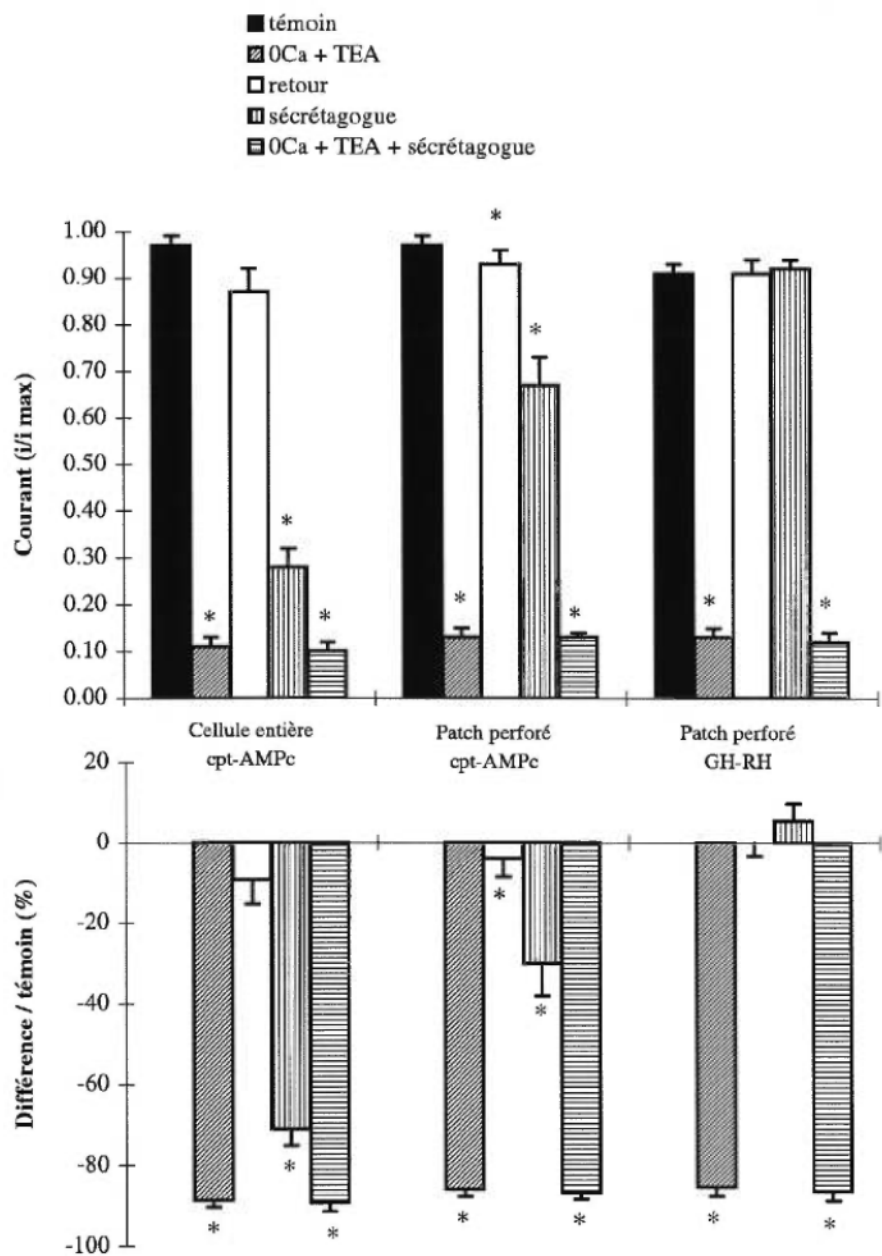
Un astérisque (*) indique les variations significatives par rapport au témoin.

Panneau supérieur

Le courant de fuite est exprimé par la variable i/i_{max} dans la situation témoin (HBSS 2Ca^{2+}), suivant une éjection continue de 15 sec. de 0Ca + 10 mM TEA et une éjection continue de 2 min. de cpt-AMPC 0,5 mM (cellule entière et patch perforé) ou GH-RH 100 nM (patch perforé).

Panneau inférieur

Les variations du courant de fuite sont exprimées en pourcentages par rapport au témoin.



perforé). Ceci suggère que la presque totalité du courant sortant exprimé par les cellules somatotropes est un courant potassique, dont une partie est calcium-dépendante. La concentration de TEA utilisée dans ce protocole est de 10 mM. De fait, le nombre de canaux potassiques inhibés dans ce milieu est plus importante qu'il ne l'était dans le milieu TEAb.

La diminution du courant sortant induite par le cpt-AMPC tant en configuration cellule entière (n=13) qu'en configuration patch perforé (n=9) (Figure 22) est nettement plus importante que celles observées précédemment (cf. 4.4.2). La diminution moyenne est de $71 \pm 4\%$ et de $30 \pm 8\%$, respectivement. La faible variation du courant sortant entre le témoin et le retour n'explique pas ces différences. Il semble donc que les effets du cpt-AMPC sont amplifiés par une éjection préalable de $0Ca^{2+} + TEA$.

La GH-RH n'a pas d'effet sur le courant sortant, et ceci malgré l'éjection préalable de $0Ca^{2+} + TEA$ (n=9) (Figure 22).

La diminution du courant sortant induite par le $0Ca^{2+} + TEA$ est similaire avant et suivant l'éjection de cpt-AMPC (configuration cellule entière et patch perforé), et de GH-RH. Ces résultats suggèrent que le cpt-AMPC ne module pas un autre courant que le courant I_{KCa} décrit précédemment.

Résumé

Le courant sortant exprimé par les cellules somatotropes est principalement potassique et majoritairement calcium-dépendant. Le cpt-AMPC semble inhiber un courant potassique calcium-dépendant. En revanche, ces résultats suggèrent que la GH-RH n'a pas d'effet apparent sur le courant sortant.

4.6 Implication de la PKA dans la dépolarisation membranaire

Les résultats présentés dans la section précédente tendent à montrer que la GH-RH active un courant de fuite sodique dans les potentiels négatifs, et que le

cpt-AMPC inhibe partiellement un courant sortant potassique calcium-dépendant, ainsi qu'un courant de fuite potassique. Ces événements pourraient être à l'origine de la dépolarisation membranaire observée lors de la stimulation des cellules somatotropes par ces deux substances. La modulation des courants ioniques impliquent souvent la phosphorylation du canal par une protéine kinase, et plus particulièrement par la PKA.

Afin de vérifier si l'un ou l'autre des courants modulés par le cpt-AMPC ou la GH-RH implique la PKA, nous avons reproduit les expériences témoins précédentes en utilisant des inhibiteurs de la PKA tels que la H89 et le Rp-AMPSc. La H89 agit sur la sous-unité catalytique de la PKA (Chijiwa *et al.*, 1990, Wong *et al.*, 1995), alors que le Rp-AMPSc agit sur la sous-unité régulatrice (Rothermel et Botelho, 1988; Wong *et al.*, 1995). Ces expériences ont été réalisées uniquement en configuration patch perforé.

4.6.1 Modulation du courant de fuite par les analogues de l'AMPC et la GH-RH

Milieu HBSS-H89

L'implication de la PKA dans la modulation du courant de fuite par le cpt-AMPC, et la GH-RH a été évaluée dans un milieu contenant H89 3 μ M. Nous avons choisi cette concentration, car elle est environ 60 fois plus importante que le K_i de la H89 pour la PKA (48 nM) (Chijiwa *et al.*, 1990). De plus, Wong *et al.* (1995) ont montré que cette concentration correspond à une inhibition de 50% de la PKA des cellules somatotropes de rat. Une éjection de 2 min. de HBSS-2Ca²⁺ induit une diminution du courant de fuite de l'ordre de $14 \pm 5,3\%$.

Nous avons testé un second analogue exogène de l'AMPC pour ce protocole: le db-AMPC à 5 mM. C'est la concentration de db-AMPC qui stimule de façon maximale la sécrétion de GH (Sheppard *et al.*, 1980).

Le cpt-AMPC (éjection de 2 min.) et le db-AMPC (éjection de 2 min.) diminuent le courant de fuite de $15 \pm 8\%$ ($n=7$) et de $28 \pm 7\%$ ($n=9$), respectivement. Le cpt-AMPC a été dilué dans un milieu HBSS- $2Ca^{2+}$ contenant H89 $3 \mu\text{M}$; le db-AMPC a été dilué dans un milieu HBSS-normal. En revanche, la GH-RH n'a pas d'effet sur le courant de fuite en présence de l'inhibiteur ($n=7$). Ces résultats sont présentés sur la Figure 23A. Leur interprétation est délicate. En effet, les diminutions produites par les éjections de HBSS- $2Ca^{2+}$ et de cpt-AMPC sont équivalentes. Le fait que la diminution induite par le db-AMPC est plus importante que ces dernières suggère que cet effet est vrai et qu'il serait indépendant de la PKA. De plus, l'absence de diminution de la fuite par la GH-RH en H89 suggère qu'elle augmente un courant qui est du même ordre que celui inhibé par le HBSS- $2Ca^{2+}$; cette augmentation ne dépendrait pas de l'activation de la PKA.

Milieu HBSS-Rp-AMPSc

Une éjection de 1 min. de cpt-AMPC diminue le courant de fuite de $16 \pm 4\%$ en présence de Rp-AMPSc $100 \mu\text{M}$ ($n=9$) (Figure 23B).

La GH-RH diminue également le courant de fuite en présence de $100 \mu\text{M}$ de Rp-AMPSc. Nous avons choisi cette concentration, car elle est environ 10 fois plus importante que le K_i du Rp-AMPSc pour la PKA (Dostmann *et al.*, 1990). De plus, Wong *et al.* (1995) ont montré que cette concentration correspond à une inhibition de 40 à 50% de la PKA des cellules somatotropes de rat. La diminution moyenne est de $25 \pm 5\%$ ($n=5$) (Figure 23B).

Les résultats obtenus avec le cpt-AMPC sont qualitativement similaires à ceux obtenus avec les deux analogues de l'AMPC en présence de H89. Ceci suggère que l'inhibition du courant de fuite par l'AMPC ne dépend effectivement pas de l'activation de la PKA. Nous n'avons pas de situation témoin (éjection de HBSS- $2Ca^{2+}$), ce qui rend difficile l'interprétation des résultats obtenus avec la

Figure 23: Modulation du courant de fuite par des analogues de l'AMPC et la GH-RH mesuré à -90 mV en présence d'inhibiteurs de la PKA.

Un astérisque (*) indique les variations significatives par rapport au témoin.

A: Panneau supérieur

Le courant de fuite est exprimé par la variable i/i max dans la situation témoin (H89 3 μ M), suivant une éjection continue de 2 min. de HBSS $2Ca^{2+}$, cpt-AMPC 0,5 mM, db-AMPC 5 mM ou GH-RH 100 nM en présence de H89 3 μ M.

Panneau inférieur

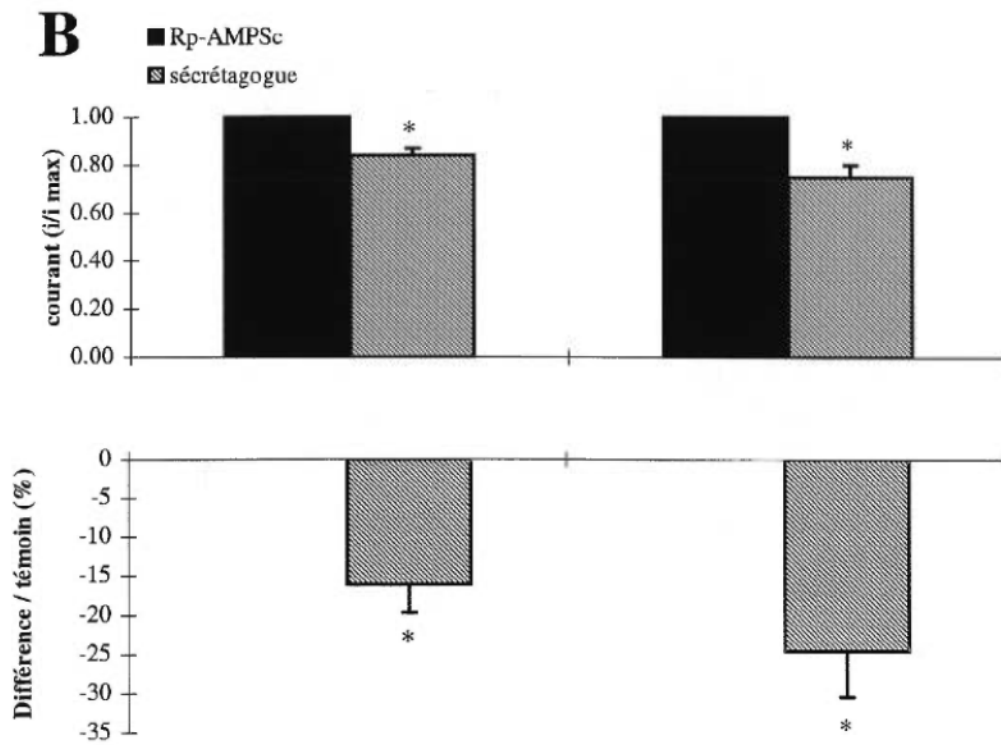
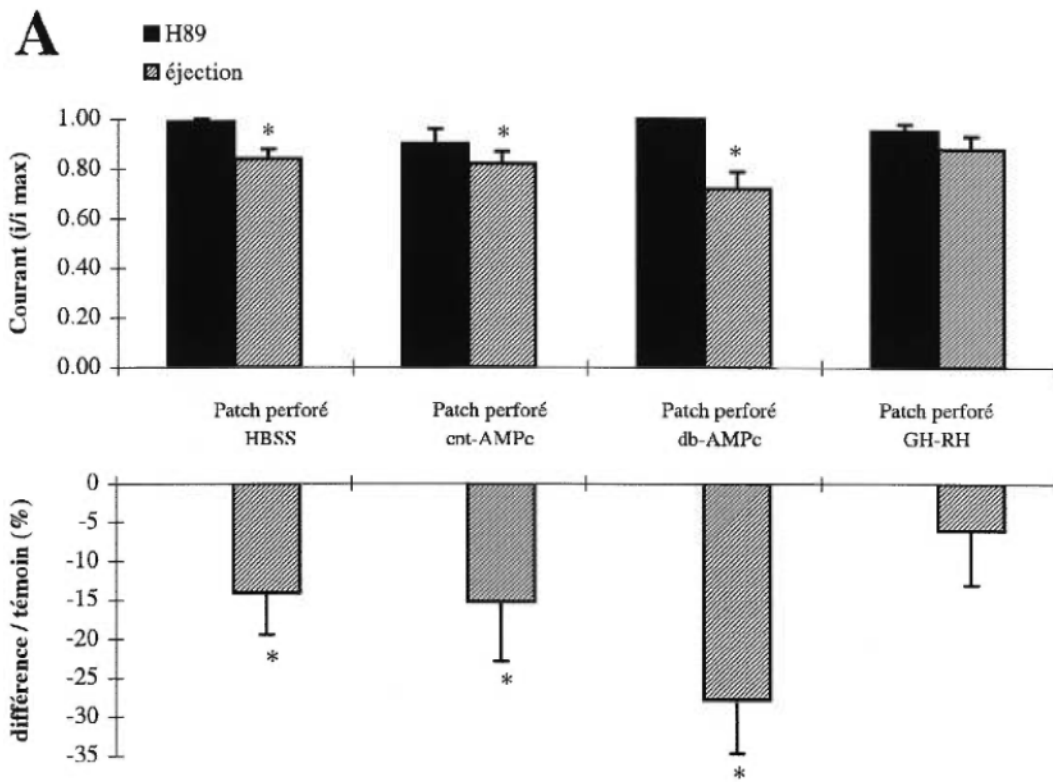
Les variations du courant de fuite sont exprimées en pourcentages par rapport au témoin.

B Panneau supérieur

Le courant de fuite est exprimé par la variable i/i max dans la situation témoin (Rp-AMPSc 100 μ M), suivant une éjection continue de 2 min. de cpt-AMPC 0,5 mM ou GH-RH 100 nM en présence de Rp-AMPSc 100 μ M.

Panneau inférieur

Les variations du courant de fuite sont exprimées en pourcentages par rapport au témoin.



GH-RH. Les faibles quantités disponibles et le coût élevé de ces produits étaient deux obstacles à la réalisation des expériences témoins.

4.6.2 Modulation du courant sortant par le cpt-AMPC et la GH-RH

Milieu HBSS-H89

L'éjection de HBSS- $2Ca^{2+}$ en présence de milieu ne modifie pas le courant sortant de manière significative par rapport au témoin (n=7) (Figure 24A). L'éjection de cpt-AMPC 0,5 mM induit une forte augmentation du courant sortant de $131 \pm 37\%$ (n=6) (Figure 24A). Cette augmentation est largement supérieure à celle observée avec l'éjection de milieu normal. Le db-AMPC induit également une forte augmentation du courant sortant, soit $99 \pm 39\%$ (n=8) (Figure 24A). Ces résultats suggèrent que l'inhibition partielle du courant sortant potassique calcium-dépendant est imputable à l'activation de la PKA. Si cela n'était pas le cas, l'augmentation du courant sortant induite par les analogues serait similaire à celle observée avec l'éjection témoin de HBSS- $2Ca^{2+}$.

L'éjection de GH-RH augmente le courant sortant de $74 \pm 27\%$ (n=7) (Figure 24A). Cette augmentation est supérieure à celle observée suivant l'éjection de HBSS. Elle n'est donc pas imputable à l'éjection elle-même, mais à un effet de la GH-RH. Cependant elle est plus faible que celle observée avec le cpt-AMPC. Ces résultats suggèrent que la GH-RH pourrait activer une conductance potassique, mais que cet effet est masqué par l'inhibition d'autres courants.

Milieu HBSS-Rp-AMPSc

L'éjection d'une min. de cpt-AMPC en présence de Rp-AMPSc 100 μ M augmente le courant sortant de $34 \pm 14\%$ (n=6) (Figure 24B)

L'éjection de 2 min. de GH-RH augmente le courant sortant de $31 \pm 7\%$ (n=5) en présence de Rp-AMPSc 100 μ M (Figure 24B). Nous n'avons pas d'éjection témoin HBSS- $2Ca^{2+}$ pour cet inhibiteur, ce qui rend équivoque

Figure 24: Modulation du courant sortant par des analogues de l'AMPC et la GH-RH mesuré à +15 mV en présence d'inhibiteurs de la PKA

Un astérisque (*) indique les variations significatives par rapport au témoin.

A Panneau supérieur

Le courant sortant est exprimé par la variable i/i max dans la situation témoin (H89 3 μ M), suivant une éjection continue de 2 min. de HBSS $2Ca^{2+}$, cpt-AMPC 0,5 mM, db-AMPC 5 mM ou GH-RH 100 nM en présence de H89 3 μ M.

Panneau inférieur

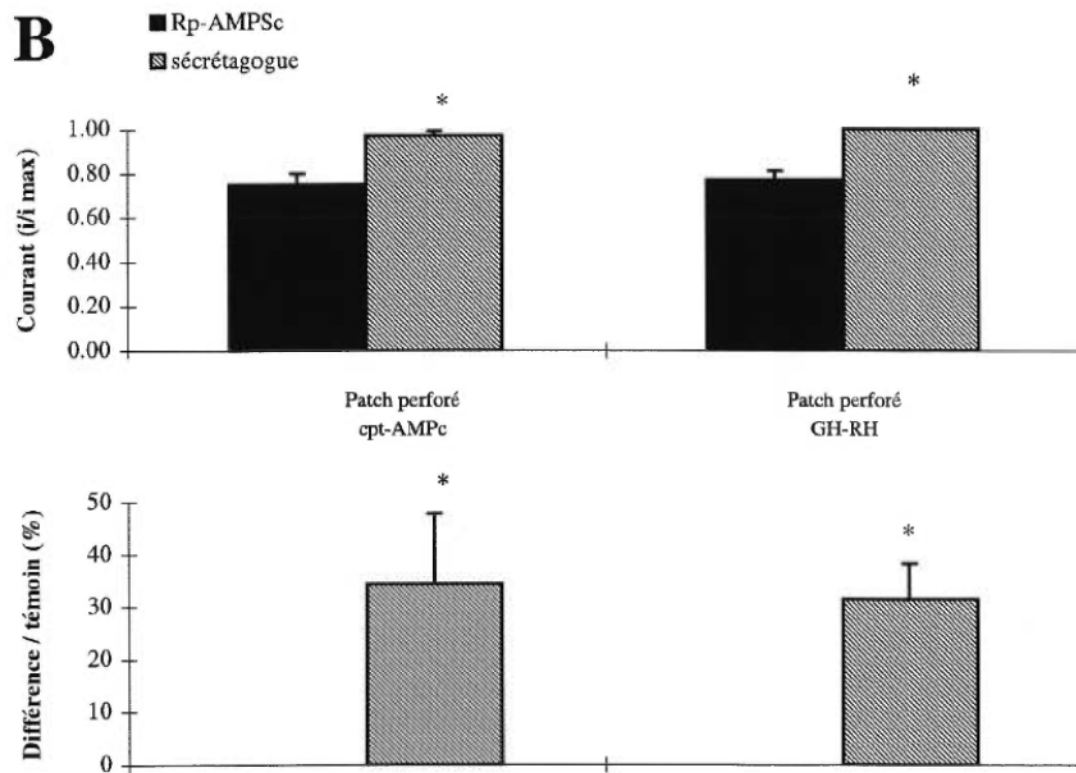
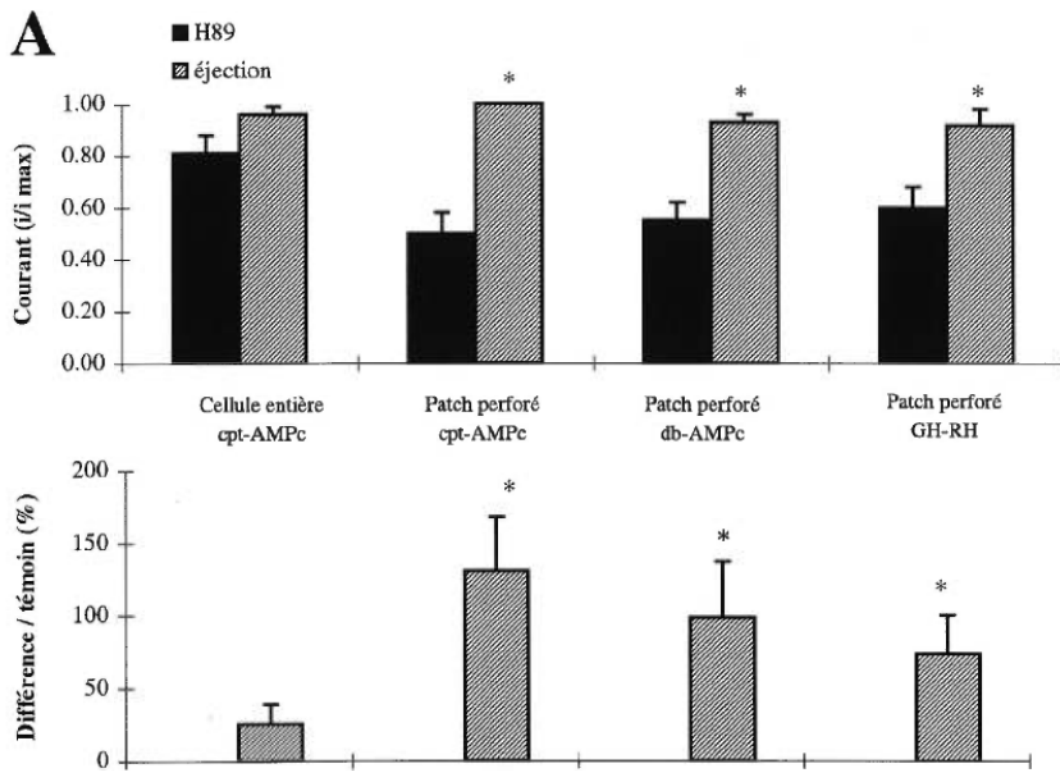
Les variations du courant sortant sont exprimées en pourcentages par rapport au témoin.

B Panneau supérieur

Le courant sortant est exprimé par la variable i/i max dans la situation témoin (Rp-AMPSc 100 μ M), suivant une éjection continue de 2 min. de cpt-AMPC 0,5 mM ou GH-RH 100 nM en présence de Rp-AMPSc 100 μ M.

Panneau inférieur

Les variations du courant sortant sont exprimées en pourcentages par rapport au témoin.



l'interprétation de ces résultats. A nouveau, les faibles quantités disponibles et le coût élevé de ces produits étaient deux obstacles à la réalisation des expériences témoins. Toutefois, nous avons obtenu, qualitativement, les mêmes résultats qu'avec la H89. De fait, sans les confirmer directement, ces observations renforcent nos conclusions sur l'activation directe des canaux potassiques par l'AMPc, et par la GH-RH par l'intermédiaire de l'AMPc.

Résumé

L'inhibition du courant de fuite TEA-sensible par le cpt-AMPc et l'activation de la conductance de fuite sodique par la GH-RH seraient indépendants de l'activation de la PKA.

Le cpt-AMPc activerait directement une conductance sortante. La GH-RH pourrait activer une conductance potassique sortante par un effet direct de l'AMPc, mais cet effet serait masqué par l'inhibition d'autres courants par la PKA.

4.7 Résumé des résultats

La sensibilité des rampes de potentiel pour l'étude des relations I/V des cellules somatotropes justifiait leur utilisation dans le cadre de cette étude. De plus, les variations de courants mesurées sont imputables à l'activité cellulaire basale et stimulée, et non pas à l'éjection elle-même.

L'effet dépolarisant de la GH-RH peut être reproduit par le cpt-AMPc. La dépolarisation est soutenue (plusieurs dizaines de sec.ondes) et la fréquence des potentiels d'action augmente dans les cellules actives.

Le courant de fuite exprimé par les cellules somatotropes comprend notamment, une composante potassique TEA-sensible et TEA-insensible, une composante sodique, et une composante calcium-sensible.

Le cpt-AMPC inhibe un courant TEA-sensible et TEA-insensible, et la GH-RH active un courant de fuite sodique. La modulation de ces courants est indépendante de l'activation de la PKA.

Le courant sortant exprimé par les cellules somatotropes est principalement potassique et majoritairement calcium-dépendant.

Le cpt-AMPC inhibe via l'activation de la PKA un courant potassique calcium-dépendant sortant. La GH-RH n'a pas d'effet apparent sur le courant sortant total. Elle pourrait, cependant, avoir un effet inhibiteur PKA-dépendant sur une conductance potassique sortante, mais cet effet serait masqué par l'activation d'autres courants AMPC-dépendant.

5 Discussion

5.1 L'effet dépolarisant de la GH-RH peut être médié par l'AMPC

L'ensemble des données obtenues en courant imposé confirme que la GH-RH dépolarise les cellules somatotropes. La dépolarisation induite par la GH-RH est de l'ordre de 10 mV, que la cellule soit active ou non. Cette dépolarisation traduit une diminution de la résistance membranaire telle que décrite par Chen *et al.* (1989). La GH-RH active l'adénylate cyclase dans les cellules somatotropes chez le rat (Narayanan *et al.*, 1989) et elle utilise l'AMPC comme second messenger (cf. section 2.5.2). Nous nous attendions à ce que l'effet dépolarisant de la GH-RH puisse être reproduit par un analogue exogène de l'AMPC. De fait, le cpt-AMPC dépolarise les cellules somatotropes et ce dans les mêmes conditions que la GH-RH. La dépolarisation membranaire observée est d'environ 10 mV dans les cellules actives et silencieuses, quelle que soit la technique utilisée (cellule entière ou patch perforé). Il semble donc que les effets dépolarisants de la GH-RH pourraient effectivement être médiés par l'AMPC.

Une dépolarisation membranaire implique la modulation de certaines conductances ioniques. Les cellules somatotropes possèdent, pour le moins, trois types de conductances ioniques. Il s'agit d'une conductance de fuite, représentée par une relation courant/voltage linéaire dans les potentiels négatifs; de conductances calciques activées entre -60 et -20 mV (se traduisant par un courant entrant); et enfin de conductances potassiques activées dans les potentiels

supérieurs à -30 mV (courant sortant). Le courant sortant exprimé par les cellules somatotropes est important (courant moyen sortant de 650 pA), d'autant plus que ce sont de petites cellules (environ 12 μm de diamètre).

5.2 La modulation de conductances ioniques est à l'origine de la dépolarisation membranaire

5.2.1 Les courants de fuite (non voltage-dépendants)

Les conductances de fuite sont caractérisées par leur insensibilité au potentiel membranaire, ce qui se traduit par une relation I/V linéaire. Le courant de fuite total exprimé par les cellules somatotropes est composé d'au moins trois courants distincts.

Le premier courant est un courant potassique. L'application de TEA diminue le courant de fuite de 20% environ. La diminution est plus faible en configuration cellule entière qu'en configuration patch perforé. Ceci peut être expliqué par la technique elle-même. En cellule entière, le patch de membrane sous l'ouverture de la pipette est rompu. De fait, comme nous l'avons mentionné précédemment, le cytoplasme diffuse dans la pipette avec le temps et certains éléments cytoplasmiques régulateurs peuvent être perdus. La diminution de 20% observée ne reflète, cependant, pas nécessairement le courant de fuite potassique total, car une partie pourrait être insensible au TEA. Ce courant participe à l'établissement du potentiel de repos cellulaire (Hammond et Tritsch, 1990).

Le second courant est un courant sodique. En effet, l'élimination des courants sodiques diminue le courant de fuite de 25% environ. Kato (Kato *et al.*, 1988; Kato et Suzuki, 1989a,b) et Naumov *et al.* (1994) suggéraient que c'est une augmentation de la conductance responsable de ce courant qui est à l'origine de la dépolarisation membranaire induite par la GH-RH.

Le troisième courant serait un courant calcium-dépendant. L'amplitude du courant de fuite augmente lorsque le calcium est retiré du milieu extracellulaire.

Cette augmentation est plus importante en configuration patch perforé qu'en configuration cellule entière par un facteur de 2 (traduisant probablement la perte de certains éléments régulateurs en cellule entière). Ce courant pourrait être un courant chlorique calcium-dépendant (I_{ClCa}). De tels courants ont été décrits dans des cellules de lignées hypophysaires telles que les GH3 (Rogawski *et al.*, 1988; Sartor *et al.*, 1992) et les AtT-20 (Korn *et al.*, 1991). Cependant, le potentiel d'équilibre du chlore, dans notre approche expérimentale, était situé aux environs de -50 mV. Si la conductance de fuite calcium-dépendante était chlorique, le retrait des ions calciques extracellulaires aurait résulté en une diminution du courant entrant à -90 mV. Cette conductance ne semble pas impliquer les ions potassiques, car le courant de fuite augmente en dépit de la présence de TEA, lors du retrait des ions calciques du milieu extracellulaire. Il est donc probable, qu'il s'agisse d'une conductance sodique calcium-sensible. Dans le muscle squelettique du rat, le calcium intracellulaire inhibe un canal sodique (Zamponi et French, 1995). Cependant, dans la situation présente, il nous est difficile de déterminer s'il s'agit d'une régulation extracellulaire ou intracellulaire car le retrait des ions calcium du milieu extracellulaire diminue l'entrée de calcium dans la cellule et, par le fait même, la concentration calcique cytosolique sous la membrane cellulaire.

Le cpt-AMPC diminue le courant de fuite. Cette diminution est similaire tant dans les cellules ayant subi un traitement réversible (0Ca + TEA ou 0Na + TEA) suivi d'une période de repos d'1 min., que dans les cellules n'ayant pas reçu de traitement préalable. Il semble, cependant, que la modulation du courant de fuite soit plus importante en cellule entière qu'en patch perforé. A nouveau cette différence peut résulter de la technique utilisée et de la perte de certains éléments régulateurs cytoplasmiques. Toutefois, bien qu'elle soit moins importante en patch perforé, la diminution est reproductible sur un grand nombre de cellules. L'AMPC semble moduler un courant de fuite TEA-sensible. En effet, si l'on élimine provisoirement les courants TEA-sensibles par une éjection de TEA 5,7 mM, la

réduction du courant induite par le cpt-AMPC n'est plus observée. Si le courant TEA-sensible modulé par le cpt-AMPC avait été un courant sodique, nous aurions observé une diminution du courant en présence de TEA et de l'élimination de la fuite calcique. Selon le même raisonnement, si la fuite modulée par le cpt-AMPC était un courant calcique, nous aurions observé une diminution du courant en présence de TEA et de l'élimination de la fuite sodique.

Toutefois, lorsque le TEA est directement appliqué dans le bain à une forte concentration (22 mM), le cpt-AMPC diminue significativement le courant de fuite. A 22 mM de TEA, l'inhibition de la fuite TEA-sensible devrait être complète. Ceci a pour conséquence de diminuer la variabilité des courants de fuite, et permet donc de détecter une petite diminution du courant. Ceci suggère qu'une partie de la fuite TEA-insensible est inhibé par l'AMPC/PKA. Il pourrait s'agir d'un courant potassique, chlorique ou même calcique. Il n'est pas sodique car il n'y a pas de différence entre le retrait des ions sodiques avant et suivant l'éjection de cpt-AMPC.

La diminution du courant de fuite induite par le cpt-AMPC persiste en présence d'inhibiteurs de la PKA: la H89 et le Rp-AMPSc. Ces résultats suggèrent que l'inhibition du courant de fuite ne dépend pas de l'activation de la PKA, mais plutôt d'une action directe de l'AMPC. La diminution est toutefois plus importante avec le db-AMPC qu'avec le cpt-AMPC en présence de H89. Or le db-AMPC n'est pas dégradé par la phosphodiesterase (Posternak et Weimann, 1974), ce qui pourrait expliquer cette différence. La plus forte concentration de db-AMPC a été choisie en fonction de son effet sur la sécrétion de la GH, donc de son effet probable d'activation de la PKA; mais en fait, il y avait 10 fois plus d'analogue de l'AMPC pouvant agir sur des sites différents que la sous-unité régulatrice de la PKA. L'accumulation d'analogue serait donc plus importante avec le db-AMPC qu'avec le cpt-AMPC. Pour ces différentes raisons, nous nous attacherons plus particulièrement à l'aspect qualitatif de l'effet des analogues, plutôt qu'à l'aspect quantitatif de leur réponse.

La GH-RH ne semble pas avoir d'effet sur le courant de fuite total. Toutefois, elle activerait une conductance sodique. En effet, si l'on élimine provisoirement les courants TEA-sensibles (éjection de 5,7 mM TEA), la GH-RH augmente le courant de fuite; cette augmentation persiste lorsque l'élimination provisoire des courants TEA-sensibles est combinée à l'élimination de la fuite calcique (10 mM TEA). Dans ces conditions, les seuls ions perméants sont les ions sodiques et les ions chlore. Si le courant modulé par la GH-RH était un courant chlore calcium-sensible, nous n'aurions pas observé d'augmentation de la fuite lors de l'élimination des courants TEA-sensibles en présence de calcium extracellulaire. Toutefois, l'augmentation est plus marquée si l'on élimine simultanément les courants calciques et les courants potassiques. Il est donc possible, sans que nous puissions le démontrer ici, que la fuite sodique modulée par la GH-RH soit, en tout ou en partie, calcium-sensible. De plus, lorsque le TEA est appliqué directement dans le bain à une forte concentration (22 mM), la GH-RH n'a pas d'effet sur le courant de fuite. Cette différence peut être expliquée par différents faits: 1) les temps d'exposition au TEA sont différents (15 sec. vs plusieurs min.); 2) les concentrations utilisées sont différentes (5,7 ou 10 mM vs. 22 mM); et 3) l'ordre de traitement est différent: lorsque la GH-RH a un effet, les concentrations de TEA sont faibles et celui-ci est administré après la GH-RH tandis que lorsque la GH-RH n'a pas d'effet, le TEA est plus concentré, et il est présent avant et pendant l'exposition à la GH-RH. L'exposition prolongée au TEA pourrait résulter en une dépolarisation soutenue et donc changer la concentration intracellulaire de calcium, et par le fait même inhiber la fuite sodique - si cette dernière est sensible au calcium.

Les résultats obtenus avec les deux inhibiteurs de la PKA sont contradictoires; la GH-RH inhibe la fuite en présence de Rp-AMPSc, mais n'a pas d'effet en présence de H89. L'activation de la fuite sodique par la GH-RH est-elle liée à un effet direct de l'AMPc? La GH-RH n'a pas d'effet sur le courant entrant en

présence de H89, ce qui corrobore les observations en milieu normal, et suggère que la modulation du courant de fuite sodique est indépendante de l'activation de la PKA. Toutefois, elle diminue le courant entrant en présence de Rp-AMPSc. Ceci peut être lié aux modes d'action différents des deux inhibiteurs. En effet, la H89 inhibe la sous-unité catalytique de la PKA lorsque cette dernière s'est dissociée de la sous-unité régulatrice, en bloquant la liaison de l'ATP (Chijiwa *et al.*, 1990, Wong *et al.*, 1995). Le Rp-AMPSc agit directement sur la sous-unité régulatrice. Il prévient la liaison de l'AMPc sur cette dernière et empêche la dissociation de l'enzyme (Rothermel et Botelho, 1988; Wong *et al.*, 1995). De plus, le Rp-AMPSc est un analogue de l'AMPc. La diminution du courant de fuite serait donc imputable à l'action combinée de l'AMPc endogène et de l'analogue sur le courant TEA-sensible. L'activation de la fuite sodique par la GH-RH serait donc, en regard de ces observations, indépendante de l'AMPc. Nous n'avons pas observé d'augmentation du courant de fuite sodique par le cpt-AMPc lors de l'élimination des courants TEA-sensibles. Cette observation, associée aux résultats obtenus avec les inhibiteurs et la GH-RH, suggère que le courant de fuite sodique activé par la GH-RH pourrait dépendre de l'activation d'un autre enzyme, plutôt que d'un effet direct de l'AMPc. Il pourrait s'agir, notamment, d'une protéine G. Un exemple d'une activation directe d'une conductance sodique par une protéine G a été décrit dans les cellules pneumocytes de type II chez le cobaye foetal (MacGregor *et al.*, 1994).

L'ensemble de ces résultats suggère une double régulation du courant de fuite par la GH-RH: l'inhibition par l'AMPc d'un courant TEA-sensible et d'un courant TEA-insensible, et l'activation d'un courant de fuite sodique. Naumov *et al.* (1994) ont montré que les changements de conductance observés lors de la stimulation des cellules somatotropes par la GH-RH pourraient résulter de l'activation d'une fuite sodique, telle que proposée par le modèle de Kato (Kato *et al.*, 1988; Kato et Suzuki, 1989a,b). Toutefois, les expériences présentées par

Naumov ont été réalisées dans un milieu témoin contenant 22 mM TEA (patch perforé). De fait, le courant TEA-sensible inhibé par l'AMPc était éliminé de leur étude. L'amplitude de la modulation du courant de fuite observée par ces auteurs est de l'ordre de 2 pA. L'amplitude du courant de fuite TEA-sensible mis en évidence dans le présent travail est de l'ordre de $3 \pm 1,7$ pA (n=24) en patch perforé. Il est probable que l'effet de ces deux courants s'annulent à -90 mV, expliquant l'absence de modulation de la fuite par la GH-RH en milieu normal. Le modèle de Kato est en partie vérifié. En effet, nous avons mis en évidence une augmentation de la fuite sodique et un rôle direct de l'AMPc. Cependant, l'AMPc module la fuite potassique et non pas la fuite sodique.

5.2.2 Les courants voltage-dépendants (sortants)

Le courant sortant exprimé par les cellules somatotropes de rat est principalement un courant potassique et il est majoritairement calcium-dépendant. En effet, l'élimination des courants potassiques diminue le courant sortant de 75% environ. De plus, l'élimination des courants calciques induit une diminution de 35 à 70% du courant sortant. A nouveau le retrait des ions calcium du milieu extracellulaire induit une variation du courant deux fois plus élevée en configuration patch perforé qu'en configuration cellule entière. Ces observations confirment la perte d'un élément régulateur cytoplasmique dans la pipette d'enregistrement. L'effet combiné de l'élimination des courants potassiques et calciques diminue le courant sortant de 90%. Nous savons que les canaux potassiques calcium-dépendants de type SK sont insensibles au TEA extracellulaire (Hille, 1991), cependant le retrait du calcium suffit à les réprimer. Nous pouvons imaginer que certains canaux potassiques ne sont pas affectés par la présence du TEA extracellulaire; cela pourrait expliquer les 10% du courant sortant restant.

Le cpt-AMPc diminue le courant sortant. Cette diminution est plus importante en cellule entière qu'en patch perforé. Certains éléments cytoplasmiques

peuvent être perdus par la dialyse cellulaire, ce qui expliquerait la différence de la modulation observée entre les deux approches. Nous nous attacherons, là encore, à l'aspect qualitatif de la réponse plutôt qu'à l'aspect quantitatif. De plus, le cpt-AMPC n'augmente pas la diminution du courant sortant produite par l'inhibition des courants calciques et potassiques TEA-sensibles. La diminution du courant par le cpt-AMPC est de surcroît inférieure à la diminution du courant par le retrait des composantes calciques ou potassiques. Ceci suggère que l'AMPC inhibe partiellement un courant potassique calcium-dépendant dans les potentiels positifs. La caractérisation de ce courant pourra être effectuée en présence d'inhibiteurs spécifiques tels que la charibdotoxine (BK) ou l'apamine (SK). Si la diminution du courant persiste en présence de charibdotoxine, le courant modulé serait un courant SK; si, en revanche, le courant ne varie pas, il s'agirait d'un courant BK. Ritchie (1987) a identifié deux courants potassiques calcium-dépendants distincts dans les cellules de la lignée hypophysaire GH3. Le plus important des deux est sensible au TEA (et pourrait être un BK), et le second est TEA-résistant mais sensible à l'apamine (caractéristique des SK). Chung et Kaczmarek (1995) ont également montré l'existence de courants BK et SK dans les cellules GH4C1.

Le cpt-AMPC et le db-AMPC augmente fortement le courant sortant en présence de H89 alors que l'éjection de HBSS $2Ca^{2+}$ n'a pas d'effet significatif. Ceci suggère que la diminution du courant sortant par l'AMPC est PKA-dépendant. Cela signifierait que la PKA activée phosphoryle un ou plusieurs types de canaux potassiques, dont un calcium-dépendant. Perez et Toro (1994) ont montré que la PKA module un canal potassique calcium-dépendant dans le myomètre de la rate et de l'humain. L'incidence de la phosphorylation du canal par la PKA varie selon que le myomètre est gravide (activation du canal) ou non (inhibition du canal). Un autre exemple de modulation d'une conductance potassique calcium-dépendante par une protéine kinase a été mise en évidence dans les cellule hypophysaires GH4C1. En effet, la protéine kinase C inhibe un courant potassique de type BK (Shipston et Armstrong, 1996).

La GH-RH n'a pas d'effet sur le courant sortant en milieu normal. Cependant, elle induit une augmentation du courant en présence de H89. Cette augmentation reste toutefois inférieure à celle produite par les analogues de l'AMPc.

L'ensemble de ces observations suggère que la GH-RH pourrait avoir un effet inhibiteur sur une conductance potassique via la PKA, mais que cet effet est masqué par l'activation du même courant ou d'un autre courant sortant par l'AMPc. Dans les cellules T humaines, l'AMPc augmente la probabilité d'ouverture d'un courant potassique (Oleson *et al.*, 1996). Nous serions donc confrontés à une double régulation du courant sortant: une activation par l'AMPc et une inhibition par la PKA. Toutefois, la sensibilité du ou des courants à l'AMPc serait plus forte que la sensibilité à la PKA. La concentration intracellulaire de cpt-AMPc est nettement plus élevée que la concentration intracellulaire d'AMPc générée par la GH-RH, ce qui pourrait expliquer la plus forte activation du courant sortant en présence des analogues de l'AMPc; la PKA serait plus fortement activée avec les analogues qu'avec la GH-RH.

Tant l'AMPc que la GH-RH dépolarisent les cellules somatotropes, mais ils agissent différemment. Les résultats discutés dans ce chapitre remettent en question le rôle de l'AMPc comme second messenger de la GH-RH dans la dépolarisation membranaire sans toutefois mettre en doute son importance dans la sécrétion de GH induite par la GH-RH. En effet, l'AMPc a un effet sur le courant sortant alors que la GH-RH ne semble pas avoir d'effet. Si la dépolarisation membranaire résulte d'une diminution du courant sortant ou de l'inhibition d'une conductance de fuite potassique, l'AMPc serait le second messenger de la GH-RH; si la dépolarisation résulte d'une augmentation du courant de fuite, l'AMPc ne serait pas le second messenger de la GH-RH.

Une dépolarisation de l'ordre de 10 mV nécessite un changement de la conductance membranaire. Cette variation résulte d'un changement de courant de l'ordre de quelques pA en potentiel imposé, autour du potentiel de repos de la cellule. Il est donc difficile d'observer les effets de la GH-RH sur les courants totaux.

Une analogie peut être faite entre le contrôle intracellulaire de la sécrétion de GH induite par la GH-RH et la sécrétion de neurotransmetteurs par les terminaisons axonales. Dans une certaine mesure, la transmission synaptique serait une forme modifiée de la sécrétion hormonale (Kandel *et al.*, 1991). A l'instar des cellules endocriniennes, les terminaisons axonales contiennent la machinerie requise pour la sécrétion d'agents chimiques possédant une fonction de signalisation (neurotransmetteurs et neuropeptides) (Kandel *et al.*, 1991). La libération des neurotransmetteurs à partir de la terminaison présynaptique dépend d'une augmentation transitoire et massive de la concentration intracellulaire de calcium. Cette augmentation dépend de l'entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire via des canaux calciques voltage-dépendants de type N (Kandel *et al.*, 1991). Ces derniers sont activés par la dépolarisation membranaire résultant de l'invasion de la terminaison par les potentiels d'action sodiques. L'activation de la conductance calcique dépend donc de l'activation préalable d'une conductance sodique. La repolarisation de la membrane est imputable à l'activation d'une conductance potassique (Kandel *et al.*, 1991).

L'activation de récepteurs présynaptiques peut moduler la libération des neurotransmetteurs. Cette modulation peut être négative ou positive. L'inhibition présynaptique permettrait un ajustement de la force de la synapse et/ou pourrait prévenir une sécrétion excessive de neurotransmetteurs (Wu et Saggau, 1997). En revanche, l'activation présynaptique permettrait d'augmenter la libération de neurotransmetteurs et pourrait être impliquée dans la potentialisation synaptique (Fagni *et al.*, 1992).

Il a été démontré que la sensibilisation à court et long-terme du réflexe de retrait des branchies chez l'aplysie est imputable à l'activation de la cascade intracellulaire de l'AMPc via l'activation de récepteurs sérotoninergiques (Kandel et Schwartz, 1982). Ces récepteurs sont situés sur la terminaison présynaptique des neurones sensoriels. La liaison de la sérotonine sur le récepteur augmente la production d'AMPc intracellulaire. L'AMPc active la PKA, qui inactive directement ou indirectement une conductance potassique calcium-dépendante de type SK. Ceci prolonge la dépolarisation de la membrane présynaptique et augmente la libération de neurotransmetteurs (Kandel et Schwartz, 1982). Chez les mammifères, un modèle équivalent a été décrit dans les neurones des collicules et de l'hippocampe. L'activation de récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT₄ induit l'inhibition d'une conductance potassique, et cet effet peut être reproduit par les analogues exogènes de l'AMPc (Andrade et Chaput, 1991; *Fagni et al.*, 1992). D'une façon similaire à ce qui a été décrit chez l'aplysie, l'inhibition de la conductance potassique augmente l'entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire, maintient la dépolarisation membranaire et augmente la libération de neurotransmetteurs.

Les objectifs initiaux de cette étude ont été atteints: 1) l'effet dépolarisant de la GH-RH pourrait effectivement être médié par l'AMPc; 2) la dépolarisation membranaire des cellules somatotropes induite par la GH-RH pourrait effectivement correspondre à l'activation d'une conductance sodique non voltage-dépendante; 3) d'autres conductances ioniques pourraient être impliquées dans les mécanismes de dépolarisation lors de la stimulation par la GH-RH et l'AMPc; et enfin 4) l'activation de la conductance de fuite sodique par la GH-RH ne dépendrait pas d'un effet direct de l'AMPc ou de la PKA.

5.3 Conclusion et critique

L'effet dépolarisant de la GH-RH pourrait être médié par l'AMPc, si la dépolarisation ne dépend pas de l'activation d'une conductance de fuite sodique. En effet, le cpt-AMPc dépolarise de façon soutenue les cellules somatotropes et augmente la fréquence des potentiels d'action dans les cellules actives. De plus, la modulation de différentes conductances ioniques, tant dans les potentiels négatifs (fuite) que dans les potentiels positifs (courant sortant), pourrait être à l'origine de la dépolarisation. Le courant de fuite des cellules somatotropes de rat est constitué d'au moins trois conductances: une conductance sodique, une conductance potassique TEA-sensible et une conductance calcium-dépendante. Le courant sortant, quant à lui, est principalement potassique et majoritairement calcium-dépendant.

En regard de nos résultats, les cellules somatotropes posséderaient un système de double régulation reposant sur le système de signalisation intracellulaire de l'AMPc. La modulation des canaux ioniques par les systèmes de seconds messagers intracellulaires est fréquente. D'après Ismailov et Benos (1995), il s'agit même d'une propriété fondamentale des canaux ioniques. Le plus souvent, il s'agit d'une modification covalente de la protéine elle-même, par une phosphorylation de résidus sérine, thréonine ou tyronine.

L'activation d'une conductance de fuite sodique par une protéine G (ou un autre enzyme) et l'inhibition d'une conductance de fuite potassique pourraient être à l'origine de la dépolarisation membranaire induite par la GH-RH. Wong *et al.* (1995) ont montré que la PKA est indispensable à la sécrétion de la GH induite par la GH-RH. En effet, la sécrétion est inhibée en présence de H89 ou de Rp-AMPSc. Les effets de la PKA observés dans cette étude pourraient être à l'origine de la dépolarisation induite par la GH-RH, et ce quel que soit le potentiel de repos de la cellule. Cependant, les effets de l'AMPc sur le courant sortant pourraient limiter les effets de l'activation de la fuite sodique et de la PKA, voire les annuler. Si un

système de double régulation est effectivement présent, la dépolarisation serait très sensible aux variations de la concentration intracellulaire d'AMPc et de PKA active. Il a été démontré que les cellules somatotropes sécrètent de l'AMPc suivant une stimulation par la GH-RH (et ceci même à une concentration de 1 nM; Horváth et al., 1995). Nous pouvons imaginer que l'effet combiné de la sécrétion d'AMPc et la dégradation de l'AMPc intracellulaire par la phosphodiesterase diminue la quantité d'AMPc cytosolique disponible. De fait, l'effet PKA sur la modulation des courants pourrait effectivement être impliqué dans la dépolarisation membranaire induite par la GH-RH.

La technique d'analyse utilisée dans le cadre de cette étude constitue une étape préliminaire de l'analyse complète. En effet, nous avons étudié les variations des courants qu'aux deux extrémités de la rampe de potentiel: à -90 et +15 mV. Le choix de ces deux valeurs était conditionné par le désir d'amplifier les réponses cellulaires. Une analyse plus complète, tenant compte des paramètres attenants aux différents courants, permettrait d'utiliser les résultats obtenus sur l'ensemble de la rampe de potentiel, et de confirmer nos conclusions. Une telle stratégie d'analyse pourrait consister en une modélisation de la membrane cellulaire basée sur les différentes conductances exprimées par les cellules somatotropes, laquelle nous permettrait d'étudier les variations des paramètres du modèle en fonction des différentes conditions expérimentales. Cette analyse est cependant complexe, et dépasse grandement le cadre d'une maîtrise. De plus, le modèle n'était pas finalisé au moment de la rédaction du présent mémoire et fera l'objet d'un article dans les mois à venir.

En regard des résultats présentés dans cette étude préliminaire, le modèle de Kato s'avère insuffisant pour expliquer la sécrétion de GH induite par la GH-RH. La dépolarisation membranaire résulterait d'une série d'activation et d'inactivation de différentes conductances de fuite et voltage-dépendantes, plutôt que de l'activation seule d'une conductance de fuite sodique. Sur la Figure 25 sont résumées nos observations. Le modèle proposé repose sur une étude préliminaire

et pourra être confirmé ou réévalué lors d'une analyse subséquente. La liaison de la GH-RH sur son récepteur membranaire active la protéine Gs et augmente la production d'AMPc intracellulaire. L'AMPc inhiberait directement une conductance de fuite potassique et une protéine G pourrait activer une conductance de fuite sodique. Parallèlement à la modulation des courants de fuite, la PKA inhiberait une conductance potassique calcium- et voltage-dépendante. Ces événements seraient suffisant pour dépolariser la membrane et activer les canaux calciques préalablement phosphorylés par la PKA. L'augmentation de calcium intracellulaire déclencherait la sécrétion de la GH.

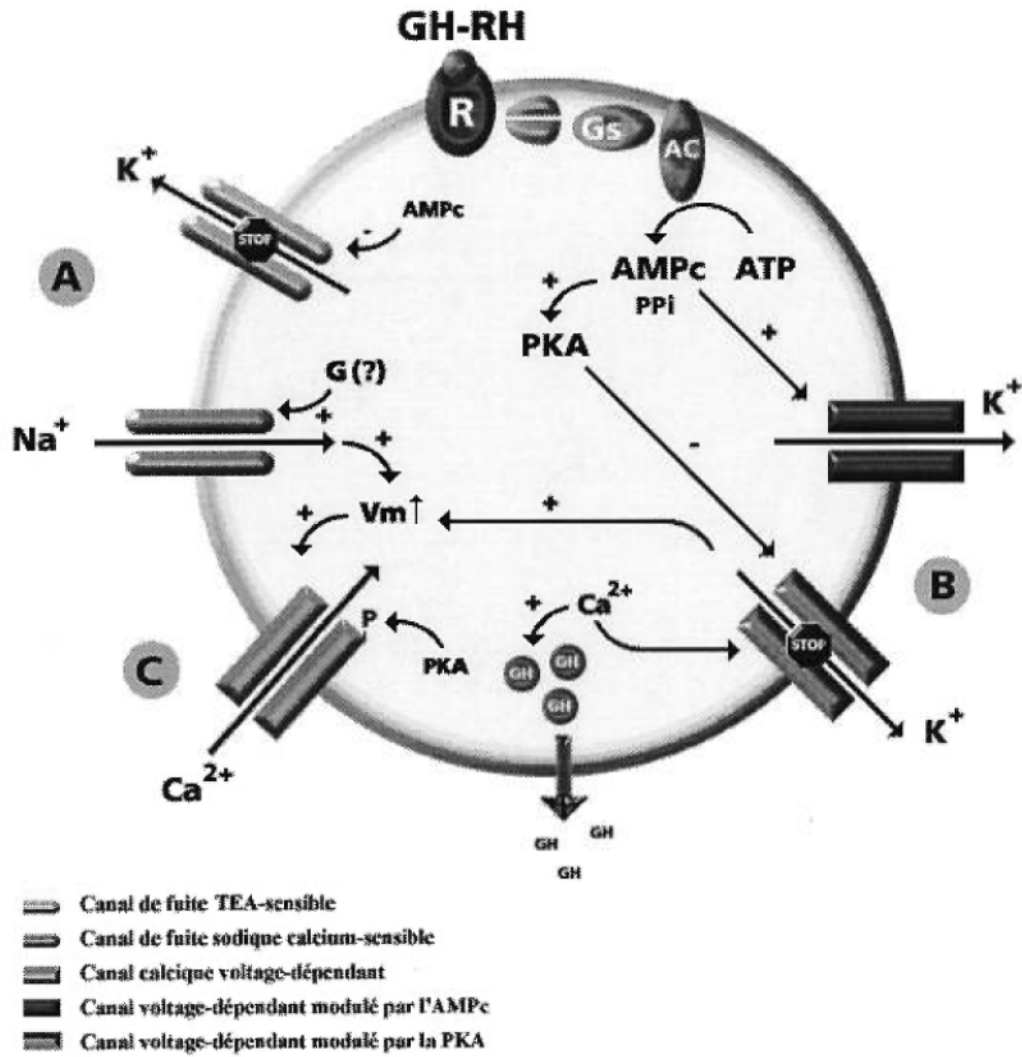
Figure 25: Modèle proposé de la modulation des courants de fuite et des courants sortants par la GH-RH

La liaison de la GH-RH sur son récepteur (R) active la protéine Gs. La sous unité $G_{\alpha s}$ lie le GTP et active l'adénylate cyclase (AC). Cette dernière catalyse l'hydrolyse de l'ATP en AMPc et en résidus phosphate (PPi). L'AMPc active la PKA.

- A** Une protéine G activerait directement une conductance sodique non voltage-dépendante. L'entrée de sodium dans le milieu intracellulaire serait suffisante pour dépolariser la membrane. L'inhibition de la conductance potassique de fuite (TEA-sensible) par l'AMPc pourrait favoriser la dépolarisation.

- B** La PKA inhibe un courant sortant calcium-dépendant, maintenant la dépolarisation membranaire. Parallèlement, l'AMPc active une conductance sortante. Le ratio AMPc/PKA active déterminerait l'importance de la modulation des courants sortants dans le maintien de la dépolarisation membranaire.

- C** La dépolarisation membranaire active les canaux calciques préalablement phosphorylés par la PKA.



Bibliographie

- Andrade R., Chaput Y. (1991) 5-hydroxytryptamine₄-like receptors mediate the slow excitatory response to serotonin in the rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 930-937.
- Arimura A., Culler M. D. (1985) Regulation of growth hormone secretion. The pituitary gland, Amura H (Ed.). Raven Press, New York pp.221-259.
- Arora KK., Sakai A., Catt K.J. (1995) Effects of second intracellular loop mutations on signal transduction and internalization of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 22820-22826.
- Bernardi H., De Weille J.R., Epelbaum J., Mourre C., Amoroso S., Slama A., Fosset M., Lazdunski M. (1993) ATP-modulated K⁺ channels sensitive to antidiabetic sulfonylureas are present in adenohypophysis and are involved in growth hormone release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 15: 1340-1344.
- Bilezikjian L.M., Vale W.W. (1983) Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* 113: 1726-1731.

- Brandt B.L., Hagiwara S., Kidokoro Y., Miyazaki S. (1976) Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J. Physiol.(Lond.)* 263: 417-439.
- Brazeau P., Ling N., Esch F., Böhlen P., Mougin C., Guillemin R. (1982) Somatocrinin (growth hormone-releasing factor) in vitro bioactivity; Ca^{2+} involvement, cAMP mediated action and additivity of effect with PGE_2 . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109: 588-594.
- Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J., Guillemin R. (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79.
- Cahalan M., Neher E. (1992) Patch clamp techniques: an overview. *Methods Enzymol.* 207: 3-14.
- Carpenter M.B. (1991) Core Text of Neuroanatomy, 4th ed. Williams & Wilkins, USA. Chapitre 10, pp. 297-324.
- Catterall W. (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242: 50-61.
- Chen C., Clarke L.J. (1995) Modulation of Ca^{2+} influx in the ovine somatotroph by growth hormone-releasing factor. *Am. J. Physiol.* 268: E204-E212.
- Chen C., Heyward P., Zhang J., Wu D., Clarke I.J. (1994) Voltage-dependent potassium currents in ovine somatotrophs and their function in growth hormone secretion. *Neuroendocrinology* 59: 1-9.

- Chen C., Israel J.M., Vincent J.D. (1989). Electrophysiological responses of rat pituitary cells in somatotroph-enriched primary culture to human growth-hormone releasing factor. *Neuroendocrinology* 50: 679-687.
- Chen C., Zhang J., Vincent J.D., Israel J.M. (1990a) Sodium and calcium currents in action potentials of rat somatotrophs: their possible functions in growth hormone secretion. *Life Sci.* 46: 983-989.
- Chen C., Zhang J., Vincent J.D., Israel J.M. (1990b) Somatostatin increases voltage-dependent potassium currents in rat somatotrophs. *Am. J. Physiol.* 259: C854-C861.
- Chen C., Zhang J., Vincent J.D., Israel J.M. (1990c) Two types of voltage-dependent calcium currents in rat somatotrophs are reduced by somatostatin. *J. Physiol.(Lond.)* 425: 29-42.
- Chihara K., Arimura A., Chihara M, Schally A.V. (1978) Effects of intraventricular administration of anti-somatostatin gamma-globulin on the lethal dose-50 of strychnine and pentobarbital in rats. *Endocrinology* 103: 912-916.
- Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayashi K., Inoue T., Naito K., Toshioka T., Hidaka H. (1990) Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D Pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 265: 5267-5272.

- Chung S., Kaczmarek L.K. (1995) Modulation of the inactivation of voltage-dependent potassium channels by cAMP. *J. Neurosci.* 15: 3927-3935.
- DeRiemer S.A. and Sakmann B. (1986) Two calcium currents in normal rat anterior pituitary cells identified by plaque assay. Calcium electrogenesis and neuronal functioning. Heinemann U., Klee M., Neher E., Singer W. (Ed.). *Exp Brain Res. Series 14*, Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 139-154.
- Deuben R.R., Meites J. (1964) Stimulation of pituitary growth hormone release by a hypothalamic extract in vitro. *Endocrinology* 74: 259-267.
- De Weille J.R., Fosset M., Epelbaum J., Lazdunski M. (1992) Effectors of ATP-sensitive K⁺ channels inhibit the regulatory effects of somatostatin and GH-releasing factor on growth hormone secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1007-1014.
- Dollander A., Fernart R. (1979) *Éléments d'embryologie*, 4ème édition, Flammarion.
- Dostmann W.R.G., Taylor S.S., Genieser H.G., Jastarff B., Doskeland S.O., Ogreid D. (1990) Probing the cyclic nucleotide binding sites of cAMP-dependent protein kinase I and II with analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphorothioates. *J. Biol. Chem.* 265: 10484-10491.
- Douglas W.W. (1968) Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* 34: 453-474.

Fagni L., Dumuis A., Sebben M., Bockaert J. (1992) The 5HT₄ receptor subtype inhibits K⁺ current in colliculi neurones via activation of a cyclic-AMP-dependent protein kinase. *Br. J. Pharmacol.* 105: 973-979.

Fox A.P, Nowycky M.C., Tsien R.W. (1987a) Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol.(Lond.)* 394: 149-172.

Fox A.P, Nowycky M.C., Tsien R.W. (1987b) Single-channel recording of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J. Physiol.(Lond.)* 394: 173-200.

French M.B., Lussier B.T., Moor, B.C., Kraicer, J. (1990) Effects of growth hormone-releasing factor on phosphoinositide hydrolysis in somatotrophs. *Mol. Cell. Endocrinol.* 72: 221-226.

Frohman L.A., Jansson J.O. (1986) Growth hormone-releasing hormone. *Endocr. Rev.* 7: 223-253.

Frohman L.A., Downs T.R., Chomczynski P. (1992) Regulation of growth hormone secretion. *Front. Neuroendocrinol.* 13: 344-405.

Ganong W.F. (1985) *Review of Medical Physiology*, 12ème édition, Lange Medical Publications, Los Altos.

Geilen C.C., Wieprecht, Wieder T., Reutter W. (1992) A selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-bromocinnamyl(amino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in HeLa cells. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 309: 381-384.

Guillemin R., Brazeau P., Böhlen P., Esch F., Ling N., Wehrenberg W.B. (1982) Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218: 585-587.

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100

Hammond C., Tritsch D. (1991) *Neurobiologie cellulaire*. Doin, Paris, France.

Hille B. (1992) *Ionic channels of excitable membranes*, 2nd ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.

Holl R.W., Thorner M.O., Leong D.A. (1988a) Intracellular concentration and growth hormone secretion in individual somatotropes: effects of growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Endocrinology* 122: 2927-2932.

Holl R.W., Thorner M.O., Leong D.A. (1989) Cytosolic free calcium in normal somatotropes: effects of forskolin and phorbol ester. *Am. J. Physiol.* 256: E375-E379.

Holl R.W., Thorner M.O., Mandell G.L., Sullivan J.A., Sinha Y.N., Leong D.A. (1988b) Spontaneous oscillations of intracellular calcium and growth hormone secretion. *J. Biol. Chem.* 263: 9682-9685.

Horikawa R., Hellmann P., Cella S.G., Torsello A., Day R.N., Muller E.E., Thorner M.O. (1996) Growth hormone-releasing factor (GRF) regulates expression of its own receptor. *Endocrinology* 137: 2642-2645.

Horn R., Marty A. (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.* 92: 145-159

Horváth J.E., Groot K., Schally A.V. (1995) Growth hormone-releasing hormone stimulates cAMP release in superfused rat pituitary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1856-1860.

Ismailov I.I., Benos D.J. (1995) Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney Int.* 48: 1167-1179

Israel J.M., Deneff C., Vincent J-D. (1983) Electrophysiological properties of normal somatotrophs in culture. *Neuroendocrinology* 37: 193-199.

Kameyama M., Hescheler J., Hofmann F., Trautwein W. (1986) Modulation of Ca current during the phosphorylation cycle in the guinea pig heart. *Pflugers Archiv. - Eur. J. Physiol.* 407: 123-128.

Kandel E.R., Schwartz H.S., Jessell T.M. (1991) *Principles of Neural Science*, 3rd ed. Appleton & Lange. Norwalk, CT, USA.

Kandel E.R., Schwartz J.H. (1982) Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* 218: 433-443.

Kato M. (1996) Growth hormone-releasing hormone augments voltage-gated Na⁺ current in cultured rat pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 270: C125-C130.

Kato M., Hattori M.A., Suzuki M. (1988) Inhibition by extracellular Na^+ replacement of GRF-induced GH secretion from rat pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 254: E476-E481.

Kato M., Hoyland J., Sikdar S.K., Mason W.T. (1992) Imaging of intracellular calcium in rat anterior pituitary cells in response to growth hormone releasing factor. *J. Physiol.(Lond.)* 447: 171-189.

Kato M., Lledo P.M., Vincent J.D. (1991) Blockade by lithium ions of potassium channels in rat anterior pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 261: C218-C223.

Kato M., Suzuki M. (1986) The time course and extracellular Ca^{2+} involvement of growth hormone (GH) releasing factor-induced GH secretion in perfused dispersed rat pituitary cells. *Jpn. J. Physiol.* 36: 1225-1239.

Kato M., Suzuki M. (1989a) Effect of Li^+ substitution for extracellular Na^+ on GRF-induced secretion from rat pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 256: C712-C718.

Kato M., Suzuki M. (1989b) Growth hormone releasing factor depolarizes rat pituitary cells in Na^+ -dependant mechanism. *Brain Res.* 476: 145-148.

Kidokoro Y., Miyazaki S., Ozawa S. (1982) Acetylcholine-induced membrane depolarization and potential fluctuations in the rat adrenal chromaffin cell. *J. Physiol.(Lond.)* 324: 203-220.

- Korn S.J., Bolden A., Horn R. (1991) Control of action potentials and Ca^{2+} influx by the Ca^{2+} -dependent current in mouse pituitary cells. *J. Physiol.(Lond.)* 439: 423-437.
- Kraicer J., Chow A.E.H. (1982) Release of growth hormone from purified somatotrophs: use of perfusion system to elucidate interrelations among Ca^{++} , adenosine 3', 5'-monophosphate, and somatostatine. *Endocrinology* 111: 1173-1180.
- Kraicer J., Spence J.W. (1981) Release of growth hormone from purified somatotrophs: use of high K^+ and the ionophore A23187 to elucidate interrelations among Ca^{++} , adenosine 3', 5'-monophosphate, and somatostatine. *Endocrinology* 108: 651-657.
- Labrie F., Gagné B., Lefèvre G. (1983) Growth hormone-releasing factor stimulates adenylate cyclase activity in the anterior pituitary gland. *Life Sci.* 33: 2229-2233
- Lazdunski M. (1994) ATP-sensitive potassium channels: an overview. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 24 (suppl. 4): S1-S5.
- Lin C., Lin S.C., Chang C.P., Rosenfeld M.G. (1992) Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360: 765-768.
- Lindau M., Fernandez J.M. (1986) IgE-mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels. *Nature* 319: 150-153.

- Llinas R., Sugimori M., Lin J.W., Cherksey B. (1989) Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 1689-1693.
- Lussier B.T., Moor B.C., French M.B., Kraicer J. (1988) Release of growth hormone from purified somatotrophs: effects of the calcium channel antagonists diltiazem and nifedipine on release induced by growth hormone-releasing hormone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66: 1373-1380.
- Lussier B.T., French M.B., Moor B.C., Kraicer J. (1991a) Free intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. I. GH-releasing factor-induced Ca^{2+} influx raises $[Ca^{2+}]_i$. *Endocrinology* 128: 570-582.
- Lussier B.T., French M.B., Moor B.C., Kraicer J. (1991b) Free intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. III. Mechanism of action of GH-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 128: 592-603.
- MacGregor G.G., Olver R.E., Kemp P.J. (1994) Amiloride-sensitive Na^+ channels in fetal type II pneumocytes are regulated by G proteins. *Am. J. Physiol.* 267: L1-L8.
- Mason W.T., Rawlings S.R. (1988) Whole-cell recordings of ionic currents in bovine somatotrophs and their involvement in growth hormone secretion. *J. Physiol. (Lond.)* 405: 577-593.

- Mayo K.E. (1992) Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol. Endocrinol.* 6: 1734-1744.
- Mayo K.E., Godfrey P.A., Suhr S.T., Kulik D.J., Rahal J.O. (1995) Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. *Recent Prog. Horm. Res.* 50: 35-73.
- Murphy B., Tuana B.S. (1989) Phosphorylation and the identification of a protein kinase activity associated with the dihydropyridine receptor isolated from rabbit heart and skeletal muscle. *Ann. NY Acad Sci.* 560: 391-394.
- Narayanan N., Lussier B., French M., Moor B., Kraicer J. (1989) Growth hormone-releasing factor-sensitive adenylate cyclase system of purified somatotrophs: effects of guanine nucleotides, somatostatin, calcium, and magnesium. *Endocrinology* 124: 484-495
- Naumov A.P., Herrington J., Hille B. (1994) Actions of growth-hormone-releasing-hormone on rat pituitary cells: intracellular calcium and ionic currents. *Pflügers Arch.* 427: 414-421.
- Neher E., Sakmann B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- Odgen D., Stanfield P. (1994) Patch clamp techniques for single channels and whole-cell recording. *Microelectrode techniques*, 2nd ed.. Odgen D. (ed). Compagny of Biologists Limited Cambridge, Angleterre. pp. 53-78.

- Oleson D.R., DeFelice L.J., Quinn M.F., Donahoe R.M. (1996) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate increases the open probability of potassium channels in activated human T cells. *J. Immunol.* 157: 1080-1086.
- Perez G., Toro L. (1994) Differential modulation of large-conductance KCa channels by PKA in pregnant and nonpregnant myometrium. *Am. J. Physiol.* 266: C1459-C1463
- Plotsky P.M., Vale W. (1985) Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science* 230: 461-463.
- Posternak T., Weimann G. (1974) The preparation of acylated derivatives of cyclic nucleotides. *Methods Enzymol.* 38: 399-409
- Rae J., Cooper K., Gates P., Watsky M. (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J. Neurosci. Methods* 37: 15-26.
- Reyl-Desmars F., Baird A., Zeytin F.N.(1985) GRF is a highly potent activator of adenylate cyclase in the normal human, bovine and rat pituitary: interaction with somatostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127: 977-985.
- Rivier J., Spiess J., Thorner M., Vale W. (1982) Characterization of a growth hormone releasing factor from a human pancreatic islet tumor. *Nature* 300: 276-278.

- Ritchie A.K. (1987) Two distinct calcium-activated potassium currents in a rat anterior pituitary cell line. *J. Physiol.(Lond.)* 385: 591-609.
- Robinson G.A., Butcher R.W., Sutherland E.W. (1971) Cyclic AMP and hormone action in Cyclic AMP. Robinson G.A., Butcher R.W. Sutherland E.W. (ed). Academic Press. New York, London, pp: 17-47.
- Rogawski M.A., Inoue K., Suzuki S., Barker J.L. (1988) A slow calcium-dependent chloride conductance in clonal anterior pituitary cells. *J. Neurophysiol.* 59: 1854-1870.
- Rothermel J.D., Botelho H.P. (1988) A mechanistic and kinetic analysis of the diastereoisomers of adenosine 3',5'-(cyclic)phosphorothioate with purified cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem. J.* 251: 757-762.
- Sackmann B., Neher E. (1995) Single channel recordings, 2ème édition. Edité par Sackmann B. et Neher E. Plenum Press, New York.
- Sartin J.L., Coleman E.S., Steele B. (1996) Interaction of cyclic AMP- and calcium-dependent mechanisms in the regulation of growth hormone-releasing hormone-stimulated growth hormone release from ovine pituitary cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 13: 229-238.
- Sartor P., Dufy-Barbe L., Vacher P., Dufy B. (1992) Calcium-activated chloride conductance of lactotrophs: comparison of activation in normal and tumoral cells during thyrotropin-releasing-hormone stimulation. *J. Membr. Biol.* 126: 39-49

Sassolas G., Chayvialle J.A., Partensky C., Berger G., Trouillas J., Berger F., Claustrat B., Cohen R., Girod C., Guillemin R. (1983) Acromégalie, expression clinique de la production de facteurs de libération de l'hormone de croissance (GRF) par une tumeur pancréatique. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 44: 347-354.

Scheer A., Fanelli F., Costa T., De Benedetti P.G., Cotecchia S., (1996) Constitutively active mutants of the alpha 1b-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J.* 15: 3566-3578.

Scherrer B. (1984) *Biostatistique*. Gaetan Morin editeur, Québec, Canada, Chapitre 15, pp: 540-548.

Seifert H., Perrin M., Rivier J., Vale W. (1985a) Binding sites for growth hormone releasing factor on rat anterior pituitary cells. *Nature* 313: 487-489.

Seifert H., Perrin M., Rivier J., Vale W. (1985b) Growth hormone-releasing factor binding sites in rat anterior pituitary membrane homogenates: modulation by glucocorticoids. *Endocrinology*. 117: 424-426.

Sheppard M.S., Kraicer J., Milligan J.V. (1980) Mechanisms governing the release of growth hormone from acutely dispersed purified somatotrophs in Synthesis and release of adenohipophyseal hormones. Jutisz M., McKerns. K.M. (ed). Plenum Publishing Corporation, New York USA, pp: 495-523

Sheppard M.S., Moor B.C., Kraicer J. (1985) Release of growth hormone (GH) from purified somatotrophs: interaction of GH-releasing factor and

- somatostatin and role of adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 117: 2364-2370.
- Shipston M.J., Kelly J.S., Antoni F.A. (1996) Glucocorticoids block protein kinase A inhibition of calcium-activated potassium channels. *J. Biol. Chem.* 19: 9197-9200.
- Shipston M.J., Armstrong D.L. (1996) Activation of protein kinase C inhibits calcium-activated potassium channels in rat pituitary tumour cells. *J. Physiol.(Lond.)* 493: 665-672
- Sims S., Lussier B.T., Kraicer J. (1991) Somatostatin activates an inwardly rectifying K⁺ conductance in freshly dispersed rat somatotrophs. *J. Physiol. (Lond.)* 441: 615-637.
- Sonksen P.H., Ayres A.B., Braimbridge M., Corrin B., Davies D.R., Jeremiah G.M, Oaten S.W., Lowy C., West T.E.T. (1976) Acromegaly caused but pulmonary carcinoid tumors. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 5: 503-513.
- Spada A, Vallar L, Giannattasio G. (1984) Presence of an adenylate cyclase dually regulated by somatostatin and human pancreatic growth hormone (GH)-releasing factor in GH-secreting cells. *Endocrinology* 115: 1203-1209.
- Spiess J., Rivier J., Vale W. (1983) Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* 303: 532-535.
- Strobl J.S., Thomas M.J. (1994) Human growth hormone. *Pharmacol. Rev.* 46: 1-34.

- Struthers, R., Perrin, M., Vale, W. (1989) Nucleotide regulation of growth hormone-releasing factor binding to rat pituitary receptors. *Endocrinology* 124: 24-29.
- Suen C.S., Chin W.W. (1993) Ligand-dependent, Pit-1/growth hormone factor-1 (GHF-1)-independent transcriptional stimulation of rat growth hormone gene expression by thyroid hormone receptors in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1719-1727
- Surks M.I., DeFesi C.R. (1977) Determination of the cell number of each cell type in the anterior pituitary of euthyroid and hypothyroid rats. *Endocrinology* 101: 946-958.
- Swanson L.W., Cunningham E.T. Jr. (1991) tiré de Ganong W.F. Review of Medical Physiology, 15ème édition. Appleton & Lange, Norwalk.
- Takano K., Takei T., Teramoto A., Yamashita N. (1996) GHRH activates a nonselective cation current in human GH-secreting adenoma cells. *Am. J. Physiol.* 270: E1050-E1057.
- Takei T., Takano K., Yasufutakano J., Fujita T., Yamashita N. (1996) Enhancement of Ca²⁺ currents by GHRH and its relation to PKA and [Ca²⁺]_i in human GH-secreting adenoma cells. *Am. J. Physiol.* 34: E801-E807.
- Tamaki M., Sato M., Matsubara S., Wada Y., Takahara J. (1996) Dexamethasone increases growth hormone (GH)-releasing hormone

- (GRH) receptor mRNA levels in cultured rat anterior pituitary cells. *J. Neuroendocrinol.* 8: 475-480.
- Tannenbaum G.S., Ling N. (1984) The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115: 1952-1957.
- Thorner M.O., Perryman R.L., Cronin M.J., Rogol A.D., Draznin M., Johanson A, Wale W., Horvath E., Kovacs K. (1982) Somatotroph hyperplasia: successful treatment of acromegaly by removal of a pancreatic islet tumor secreting a growth hormone-releasing factor. *J. Clin. Invest.* 70: 965-977.
- Velicelebi G., Santacrose T.M., Harpold M.M. (1985) Specific binding of synthetic human pancreatic growth hormone releasing factor (1-40-OH) to bovine anterior pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 33-39.
- Wang X., Inukai T., Greer M.A., Greer S.E. (1994) Evidence that Ca²⁺-activated K⁺ channels participate in the regulation of pituitary prolactin secretion. *Brain Res.* 31: 83-87.
- Wong A.O., Moor B.C., Hawkins C.E., Narayanan N., Kraicer J. (1995) Cytosolic protein kinase A mediates the growth hormone (GH)-releasing action of GH-releasing factor in purified rat somatotrophs. *Neuroendocrinology* 61: 590-600.
- Wu L.G., Saggau P. (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 20: 204-212.

Zamponi G.W., French R.J. (1995) Sodium current inhibition by internal calcium: a combination of open-channel block and surface charge screening? *J. Membr. Biol.* 147:1-6

Remerciements

Je tiens à remercier Benoît Lussier pour sa direction et son soutien durant ces deux dernières années, et durant la rédaction de ce mémoire. Je remercie également Audrey Petit pour son aide précieuse au sein du laboratoire.

Je remercie affectueusement ma famille pour son soutien et son aide durant mes études à Montréal.

Je tiens également à remercier Thérèse Cabana, Trevor Drew, Guy Doucet et Benoît Lussier pour m'avoir fait découvrir et aimer la recherche. Je souhaite être à la hauteur de l'enseignement théorique et pratique qu'ils m'ont dispensé.

Je remercie tous ceux qui ont été à mes côtés durant ces dernières années, et tout particulièrement Marie-Danielle Salha, Nathalie Bolduc, Juli Aubin, Sylvain Dubuc, Normand Montour et Claire Cloutier, et la famille Marcotte pour leur soutien et leurs encouragements.