

Université de Montréal

**MÉCANISMES INTRACELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS LES
CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES INDUITS PAR LA DOPAMINE
SUR LES CELLULES LACTOTROPES DE RATS**

par

HO BAO LOC NGUYEN

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès science (M. Sc.)

Juillet 1999

© BAO NGUYEN, 1999



W
4
U58
1999
V.123

IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

MÉCANISMES INTRACELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS LES CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES INDUITS PAR LA DOPAMINE SUR LES CELLULES LACTOTROPES DE RATS

Présenté par :

Bao Nguyen

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteur R-Marc Pelletier.....président –rapporteur

Docteur Maria Leiza Vitale.....directrice de recherche

Docteur Michel Bushmann.....membre du jury

Mémoire accepté le :...99-10-28

Sommaire

Il est bien connu que le cytosquelette d'actine est impliqué dans les mécanismes de sécrétion où il jouerait un rôle inhibiteur. Au cours de mon projet de recherche, nous avons cherché à mieux comprendre l'implication du cytosquelette d'actine dans l'inhibition de la sécrétion de l'hormone hypophysaire: la prolactine (PRL). Des résultats de notre laboratoire ont démontré que la dopamine, un inhibiteur de la sécrétion de prolactine, stabilise le cytosquelette cortical d'actine des cellules sécrétrices de prolactine, les lactotropes. Ces changements induits par la dopamine font partie du mécanisme menant à l'inhibition de la sécrétion de la prolactine (Carbajal et Vitale, 1997). Nous avons analysé dans ce projet les voies de signalisation par lesquelles la dopamine modifie le cytosquelette d'actine. Nos résultats indiquent que la dopamine, via l'activation des récepteurs D2, induit le réassemblage de filaments corticaux d'actine, la dissolution des filaments cytoplasmique d'actine et l'arrondissement des cellules lactotropes. Ces effets sont propres aux cellules lactotropes et ils sont indépendants de la présence d'autres types de cellules hypophysaires dans les cultures. L'inhibition de la synthèse de l'AMPc, la réduction des concentrations de Ca^{2+} intracellulaires, l'inactivation de la petite protéine GTPase rho, l'inhibition de tyrosine kinases sont toutes des

voies de signalisation impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et les changements morphologiques des cellules lactotropes induits par la dopamine. De plus, l'étude de la présence dans les cellules lactotropes des protéines d'ancrage qui affectent l'architecture spatiale des filaments d'actine démontre que les changements morphologiques induits par la dopamine s'accompagnent d'une augmentation de l'association de la taline à la fraction membranaire, d'une diminution de l'association de la myosine à la fraction cytosolique et d'une augmentation de l'expression de l' α -actine à la fraction cytosolique. Ces changements pourraient être à la base de la réorganisation du cytosquelette d'actine des lactotropes induits par la dopamine. Ces effets de la dopamine sur le cytosquelette d'actine des lactotropes pourraient être la cause de la réduction de la taille des macrolactinomes qui suit l'administration des agonistes dopaminergiques.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	I
IDENTIFICATION DU JURY	II
SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
DÉDICACE	XVI
INTRODUCTION	1
1. LA PROLACTINE	2
1.1 La molécule de prolactine	4
1.2 Localisation, morphologie et hétérogénéité fonctionnelle des cellules lactotropes	6
1.2.1 Localisation dans l'hypophyse	6
1.2.2 Aspect morphologique des cellules lactotropes.....	7
1.2.3 Hétérogénéité fonctionnelle	9
1.3 Régulation dans la sécrétion de prolactine	10
1.3.1 Contrôle autocrine et paracrine de la sécrétion de prolactine (PIFs)	11
1.3.2 Les facteurs inhibiteurs de la sécrétion de prolactine (PIFs)	13
La dopamine	13

Le GABA (Acide γ -Aminobutyrique), la Somatostatine

et le GAP (Gonadotrophin-Releasing Hormone associated Peptide)	16
1.3.3 Les facteurs stimulateurs de la sécrétion de prolactine (PRFs)	19
Le VIP (Vasoactive intestinal peptide)	20
La TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone)	21
2. Rôle du cytosquelette dans la sécrétion hormonale	22
Les microtubules	24
Les microfilaments	27
Les filaments intermédiaires	31
MATÉRIELS ET MÉTHODES	33
Culture cellulaire et purification de lactotropes	33
Identification des différents types cellulaires de l'hypophyse antérieure	36
Étude des changements morphologiques des cellules lactotropes lors de la stimulation/inhibition de la sécrétion de prolactine	40
Localisation des différentes protéines associées au cytosquelette d'actine dans les cellules lactotropes	41
Fractionnement sous-cellulaire	42
Obtention de la fraction membranaire	42
Extraction de la fraction du cytosquelette	43
Dosage de protéines des échantillons	44
Électrophorèse sur gels dénaturants SDS-polyacrylamide et western blot	44
Sources des produits chimiques et des anticorps	46

RÉSULTATS	47
1. CARACTÉRISATION DE L'EFFET DE LA DOPAMINE SUR LA MORPHOLOGIE DES CELLULES HYPOPHYSAIRES	47
Effet de la dopamine sur le cytosquelette d'actine et la forme des cellules lactotropes en culture	47
Étude dose-réponse	48
L'effet de la dopamine implique l'activation des récepteurs D2 dopaminergiques	49
La dopamine et la bromocriptine affectent uniquement la morphologie des cellules lactotropes	49
Étude cinétique de l'effet de la dopamine sur la forme des cellules lactotropes	50
La dopamine agit directement sur les lactotropes	50
2. ÉTUDE DES VOIES INTRACELLULAIRES IMPLIQUÉES DANS L'ARRONDISSEMENT DES CELLULES LACTOTROPES INDUITS PAR LA DOPAMINE	51
L'AMPC	
La forskoline, un inhibiteur de l'adénylate cyclase	52
Le 8BrAMP, un stimulateur de la PKA	54
L'inhibiteur de la PKA, le KT5720	55
Le calcium	56
La voie de l'inositol 1,4,5-triphosphate / protéine kinase C (PKC)	57
Implication d'autres voies de signalisation intracellulaires dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et le maintien du phénotype arrondi des cellules lactotropes induits par la dopamine.	
Participation de la petite GTPase rho	58
Participation des tyrosine kinases	59
3. ÉTUDE DE L'EFFET DE LA DOPAMINE SUR L'EXPRESSION ET LA LOCALISATION DE QUATRE PROTÉINES D'ANCRAGE DES FILAMENTS D'ACTINE : LA MYOSINE, LA VINCULINE, L' α -ACTININE ET LA MYOSINE II.	
La taline	62

La vinculine	63
L' α -actinine	63
La myosine	63
DISCUSSION	96
Effet de la dopamine sur le cytosquelette d'actine et la forme des cellules lactotropes	97
Les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'arrondissement des cellules lactotropes induits par la dopamine. Le rôle de l'AMPc	101
Le rôle du Ca ²⁺	103
Le rôle de la phospholipase C	104
Le rôle de la petite GTPase rho	105
Participation des tyrosines kinases	108
Étude de l'effet de la dopamine sur l'expression et la localisation de quatre protéines d'ancrage des filaments d'actine: la taline, la vinculine, l' α -actinine et la myosine II. La taline	111
La vinculine	113
L' α -actinine	114
La myosine	114
CONCLUSION	116
BIBLIOGRAPHIE	117
REMERCIEMENTS	153

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Pourcentage de chaque type cellulaire retrouvé dans une culture mixte de cellules hypophysaire.

Tableau 2. Pourcentage de chaque type cellulaire issue d'une séparation de la population mixte de cellules hypophysaires en couches enrichies à l'aide d'un gradient de Percoll.

LISTES DES FIGURES

- figure 1.** Séparation de la population mixte de cellules hypophysaires en couches enrichies en certains types de cellules hypophysaires à l'aide d'un gradient de Percoll.
- figure 2.** Effet de la dopamine sur le cytosquelette d'actine et la forme des cellules lactotropes en culture.
- figure 3.** Étude dose-réponse de l'effet de la dopamine et de la bromocriptine sur la forme des cellules lactotrope.
- figure 4.** Étude cinétique de l'effet de la dopamine sur la forme des cellules lactotropes (A et C) et non-lactotropes (B).
- figure 5.** Étude dose-réponse de l'effet de la forskoline sur la forme des cellules lactotropes.
- figure 6.** Étude cinétique de l'effet de la forskoline sur la morphologie des cellules lactotropes.
- figure 7.** Étude de l'effet de la forskoline sur les changements morphologiques des cellules lactotropes induits par la dopamine.
- figure 8.** Étude de l'effet de la forskoline sur les changements de la forme des cellules lactotropes traitées au préalable avec la dopamine ou la bromocriptine.
- figure 9.** Étude cinétique de l'effet du 8BrAMPC sur la forme des cellules lactotroes.
- figure 10.** (A) Étude dose-réponse de l'effet de l'inhibiteur de la PKA, le KT5720,

sur la forme des cellules lactotropes.

(B) Étude de l'effet de l'inhibiteur de la PKA, le KT5720, sur les changements de la forme des cellules lactotropes induits par la dopamine ou la forskoline.

figure 11. Étude de l'effet de l'inhibiteur des canaux calciques de typ-L nifedipine, sur les changements de la forme des cellules lactotropes induits par la dopamine ou la forskoline.

figure 12. Étude de l'effet de l'inhibiteur de la phospholipase C, la néomycine, sur les changements de la forme des cellules lactotropes induits par la dopamine ou la forskoline.

figure 13. Étude de l'effet de l'inhibiteur de la petite GTPase, *Clostridium botulinum* exoenzyme C3, sur les changements de la forme des cellules lactotropes induits par la dopamine ou la forskoline.

figure 14. (A) Étude cinétique de l'effet de l'inhibiteur des tyrosines kinases, la génistéine, sur la forme des cellules lactotropes.

(B) Étude de l'effet de l'inhibiteur des tyrosines kinases, la génistéine, sur la forme des cellules lactotropes.

figure 15. Étude de l'effet de la dopamine sur l'association aux membranes (A) et au cytosquelette (B) de quatre protéines d'ancrage des filaments d'actine : la taline, la vinculine, l' α -actinine et la myosine II.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH	hormone corticotrophine
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ADP	adénosine-diphosphate
ATP	adénosine-triphosphate
BrAMPc	bromo-adénsyl-monophosphate cyclique
BrC	bromocriptine
c	contrôle
cy	fraction cytosolique
cyt	fraction cytosquelettique
DA	dopamine
DMEM	<i>Dulbecco's modified essential medium</i>
F	forskoline
FSH	hormone folliculostimulante
GABA	acide γ -aminobutyrique
GAP	gonadotrophin-releasing hormone associated peptide
GDP	guanosine diphosphate
Gé	génistéine
GH	hormone de croissance

GTP	guanosine-triphosphate
h	heure
IgG	immunoglobuline de type G
IgM	immunoglobuline de type M
IP ₃	inositol triphosphate
KDa	kilodalton
LH	hormone lutéinisante
m	fraction membranaire
MAP	protéines associées aux microtubules
μg	micro gramme
μM	micromolaire
μm ²	(micromètre) ²
mM	milli-molaire
Néo	néomycine
Nif	nifedipine
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
PBS	solution saline-tampon phosphate (<i>phosphate buffered saline</i>)
PIFs	facteurs inhibiteurs de la sécrétion de prolactine (<i>prolactin-inhibiting factors</i>)
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-diphosphate

PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PRFs	facteurs stimulateurs de la sécrétion de prolactine (<i>prolactin-releasing factors</i>)
PRL	prolactine
s	fraction soluble
TRH	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
TRITC	tétraméthylrhodamine
TSH	hormone thyroïdienne
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>

DÉDICACE

À mes parents pour leur amour inconditionnel.

Je vous aime et merci !

Bao

Introduction

L'**hypophyse**, appelée aussi **glande pituitaire**, est située dans la selle turcique de l'os sphénoïde. L'hypophyse est reliée à la base de l'hypothalamus par une tige, la tige hypophysaire ou infundibulum formée par des terminaisons nerveuses et par des vaisseaux sanguins du système porte hypothalamo-hypophysaire. L'hypophyse comprend une partie épithéliale, l'adénohypophyse, et une partie nerveuse, la neurohypophyse. L'**adénohypophyse** est formée d'un lobe antérieur (*pars distalis*), d'un lobe intermédiaire (*pars intermedia*) et d'une partie associée à la tige hypophysaire, *la pars tubérialis*. La **neurohypophyse** est composée du lobe postérieur (*pars nervosa*), de la tige pituitaire et de l'éminence médiane dans la base de l'hypothalamus.

Les sécrétions de l'adénohypophyse et de la neurohypophyse jouent un rôle physiologiques très important en agissant directement sur des cellules cibles ou sur des glandes endocrines secondaires. Le lobe antérieur de l'hypophyse contient cinq classes de cellules qui sécrètent des hormones qui ont des effets physiologiques distincts: 1) les cellules lactotropes, qui synthétisent la prolactine (PRL), 2) les cellules somatotropes, qui synthétisent l'hormone de croissance (GH), 3) les cellules corticotropes qui synthétisent l'hormone corticotrophine (ACTH), 4) les cellules gonadotropes, qui synthétisent l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) et, 5) les cellules thyrotropes, qui synthétisent l'hormone thyrotrophine (TSH). De plus, le lobe antérieur contient des cellules agranulaires, appelées cellules folliculo-stellaires. Ces cellules ne produisent pas d'hormone, mais

elles participeraient à la communication entre les différents types des cellules hormonales. Les cellules folliculo-stellaires expriment la protéine S-100 et la protéine fibrillaire gliale acide qu'on ne retrouve pas dans les autres types de cellules de l'hypophyse et ce qui permet de les identifier parmi les autres cellules hypophysaires (Baes et al., 1987).

1. LA PROLACTINE

La **prolactine** (PRL) est une hormone sécrétée principalement par le lobe antérieure de l'hypophyse. Les cellules déciduales du placenta (Handwerger et al., 1990), les cellules de l'endomètre (Masler et Riddick, 1979) et du myomètre urérine (Walters et al., 1983), certaines cellules du système immunitaire tel les thymocytes, les lymphoblastes et les lymphocytes T (Gala, 1991) et les mammosomatotropes, sont toutes des cellules qui sécrètent aussi la prolactine.

La prolactine est présente chez tous les vertébrés du poisson à l'humain. Les mâles sécrètent normalement moins de prolactine que les femelles. De même, la régulation de la sécrétion de prolactine est différente chez le mâle et la femelle. L'hypersécrétion de prolactine, souvent reliée à des problèmes neuroendocriniens, est une des causes majeurs d'infertilité chez la femme et d'impuissance chez l'homme. La prolactine contrôle divers fonctions physiologiques incluant la lactation, la croissance et le développement des glandes mammaires, le cycle ovarien, l'osmorégulation et la régulation du système immunitaire.

La lactation est la sécrétion de lait par les glandes mammaires. L'augmentation des taux d'oestrogènes, de progestérones et de lactogène placentaire vers la fin de la grossesse stimule la libération du facteur déclenchant la sécrétion de prolactine par l'hypothalamus. L'adénohypophyse réagit en sécrétant la prolactine laquelle est responsable de contrôler la croissance, la différenciation et la régulation de la sécrétion des cellules épithéliales mammaires (Koldowski, 1980; Grosvenor et al., 1992). La concentration de prolactine dans le lait est très élevée, et cette concentration régularise multitudes d'activités biologiques et immunologiques (Kacsoh et al., 1991). Ainsi la prolactine dans le lait peut induire différents effets hormonaux chez le nouveau né (Grosvenor et al., 1992). Grosvenor et al. (1983) ont démontré qu'une déficience neurorégulatrice peut être induite à l'âge adulte lorsque des nouveaux nés sont nourris avec du lait contenant de faibles concentrations de prolactine. Après l'accouchement, la sécrétion de prolactine retourne graduellement à son niveau antérieur. La production de lait dépend de la stimulation mécanique des mamelons, normalement exercée par le bébé qui tète. Les mécanorécepteurs du mamelon envoient des influx nerveux afférents à l'hypothalamus, ce qui stimule la sécrétion des facteurs stimulateurs de la sécrétion de prolactine. Celui-ci provoque la libération d'une giclée de prolactine qui stimulera la production du lait nécessaire pour la tétée suivante. L'ocytocine provoque le réflexe d'éjection du lait par les alvéoles des glandes mammaires. La prolactine est aussi une hormone impliquée dans le développement et la maturation de l'ovocyte c'est-à-dire la croissance des follicules, la maturation de l'ovocyte et l'ovulation (Khan-Dawood, 1988).

La prolactine module aussi le système immunitaire. Des études ont démontré que les rats et les souris hypophysectomisés présentent des déficiences fonctionnelles et cellulaires du système immunitaire telle une diminution de la production d'anticorps (Lunkin et al., 1960), une diminution de la prolifération de lymphocytes (Prentice et al., 1976), une diminution de l'activité des cellules NK (natural killer) (Saxena et al. 1982), une prolongation de survie des greffes (Comsa et al., 1975) et l'incapacité de développer de l'arthrite adjuvant (Toivanen et al., 1967). Il a été démontré que l'administration de prolactine ou de GH peut corriger toutes ces déficiences (Gala, 1991). L'administration de bromocriptine, une substance qui bloque spécifiquement la sécrétion de prolactine, induit les mêmes effets sur le système immunitaire que l'hypophysectomie, et de même la prolactine et la GH corrigent ces déficiences.

1.1. La molécule de prolactine

La **prolactine** est une hormone protéique dont le poids moléculaire est approximativement de 23 kDa (Sinha, 1995). Chez la majorité des mammifères, l'hormone est composée de 197-199 acides aminés avec trois ponts disulfures intramoléculaires entre les séquences 4-11, 58-174, et 191-199 (Sinha, 1995). La prolactine humaine est composée de 198 résidus d'acides aminés. La similitude de séquences avec la prolactine de rat, de cochon et de mouton est respectivement de 60, 77 et 73%. Du point de vue structural, la prolactine ressemble à l'hormone de croissance. Chez l'humain, la similitude de séquences entre la prolactine et l'hormone de croissance est de 16% (Bouvier et al., 1987). L'hypophyse est la source la plus

riche en prolactine. Par contre, la prolactine se retrouve aussi dans des tissus et organes tels le placenta (Handwerger et al., 1990), les glandes mammaires (Nolin et Witorsch, 1976), le corps lutéal (Nolin, 1978), les glandes surrénales (Nolin, 1978), la prostate (Harper et al., 1981), les glandes surrénales (Tsubura et al., 1986), les intestins (Stevens et Shaw, 1982) et l'utérus (Masler et Riddick, 1979; Walters et al., 1983).

La prolactine peut exister sous plusieurs formes: glycosylée, phosphorylée, désaminée, sulfatée, en dimères et polymères, libre ou liée à des protéines (Sinha, 1995). La prolactine glycosylée (25-56 kDa) peut se retrouver dans les extraits de cellules hypophysaires (Bollengier et al., 1989; Bollengier et al., 1993), le sérum et le lait de mâles ou de femelles normaux (Kacsoh et al., 1991; Champier et al., 1992; Kacsoh et al., 1993) et sa concentration peut varier selon le stade physiologique de l'individu telle la grossesse chez la femme (Markoff et Lee, 1987; Markoff et al., 1983) et le cycle estral chez le rat (Vitale et al., 1987). La fonction exacte de la prolactine glycosylée n'est pas encore définie, cependant dans d'autres protéines il est connu que les résidus carbohydrates contribuent à la stabilisation et à la sécrétion de ces protéines, et à la reconnaissance des récepteurs qui régularisent les sites d'endocytose (Schachter, 1984; Rademacher et al., 1988). Ainsi chez l'humain et les animaux, différentes formes de la molécule de prolactine seront préférentiellement libérées dans la circulation sanguine en réponse à différents stimulants physiologiques et pathologiques (Farkouh et al., 1979; Gala et Hart, 1980; Lawson et al., 1980).

L'hétérogénéité dans la forme de la molécule de prolactine soulève les hypothèses suivantes. Il existerait plusieurs sous-populations de cellules lactotropes spécialisées dans la sécrétion d'une forme spécifique de prolactine, ou bien que toutes les cellules lactotropes possèderaient la capacité de sécréter plusieurs formes de prolactine sous différentes conditions physiologiques.

1.2 Localisation, morphologie et hétérogénéité fonctionnelle des cellules lactotropes

1.2.1 Localisation dans l'hypophyse

En général, les cellules lactotropes sont dispersées à l'intérieur du lobe antérieur de l'hypophyse sans aucune localisation spéciale, sauf dans certains cas dans lesquels de petits amas de 5 à 10 cellules lactotropes peuvent se former (Nagomi et Yoshimura, 1982). Papka et al. (1986) ont démontré que lors de la lactation, les cellules lactotropes de rat sont concentrées principalement dans deux régions de l'hypophyse: une région étroite et périphérique (zone extérieure), et une région central beaucoup plus large (zone intérieure). Par des études immunocytochimiques, ces auteurs ont démontré que les cellules lactotropes présentes dans la zone extérieure libèrent la prolactine beaucoup plus rapidement que celles de la zone intérieure. Cela suggère que la localisation des cellules à l'intérieure de l'hypophyse est impliquée dans l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules lactotropes. Le nombre de cellules lactotropes peut varier entre 5×10^6 à 7×10^6 de cellules ce qui constitue environ 40-

50% de la population de cellules hypophysaires (Luque et al., 1986; Smith et al., 1986; Dada et al., 1984). Les femelles possèdent plus de cellules lactotropes que les mâles. En général, selon le sexe, l'âge et le stade physiologique de l'animal le nombre de cellules lactotropes dans l'hypophyse peut varier légèrement.

1.2.2 Aspect morphologique des cellules lactotropes

L'étude immunocytochimique au microscope à fluorescence des cellules lactotropes en culture traitées avec aucun facteur régulateur montrent que ces cellules possèdent une forme polygonale. Les filaments d'actine cytoplasmiques sont évidents et le cytosquelette cortical d'actine est discontinu (Carbajal et Vitale, 1997). Par contre, dans les cellules traitées avec la dopamine, une situation expérimentale qui ressemble à la situation « in vivo », les filaments d'actine se retrouvent dans la région cortical. Les études d'immunohistochimie de Kurihara H et Uchida K (1987) ont montré que dans les cellules lactotropes « in situ », l'organisation du cytosquelette d'actine cortical ressemble de près à la localisation que nous avons trouvée dans les cellules cultivées en présence de dopamine. Les études en microscopie électronique de M. Bendayan et D. Maestracci (1984), en utilisant la technique d'immunocytochimie à l'or colloïdale combinée à la protéine A, ont démontré que dans les cellules lactotropes qui sécrètent activement, la concentration de prolactine immunoréactive augmente graduellement à partir de la région du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi et aux granules de sécrétion immatures et matures. Ces résultats démontrent que dans les cellules lactotropes, la molécule de prolactine est synthétisée sur les polyribosomes du

réticulum endoplasmique. Par la suite, elle est transférée à l'appareil de Golgi pour y être emmagasinée dans des granules de sécrétion (Palade, 1975). Par ailleurs, les lysosomes ont la capacité de détruire et dégrader la prolactine intracellulaire, cela représente une façon de contrôler la concentration de prolactine dans l'hypophyse par exemple une fois fini la période de lactation (Kuriakose et al., 1989). De plus, les taux de synthèse et de sécrétion de prolactine sont modulés par une variété de facteurs et d'hormones d'origine nerveuse et périphérique (voir 1.3 Régulation de la sécrétion de prolactine).

Chez l'homme comme chez le rat, il existe une hétérogénéité morphologique des cellules lactotropes (Cheever et Lewis, 1969; Friesen et al., 1970). Tout d'abord, les cellules lactotropes contiennent plusieurs granules de sécrétion dont leurs dimensions sont très variables. Il y a des granules petits (250-300 nm de diamètre) ou larges (500-900 nm de diamètre) (Farquhar et al., 1975). À l'intérieur de ces granules, différentes formes de la molécule de prolactine peuvent coexister et certaines seront préférentiellement libérées dans la circulation sanguine en réponse à différents stimulants physiologiques et pathologiques (Farkouh et al., 1979; Gala et Hart, 1980; Lawson et al., 1980). En général, ce sont les gros granules de sécrétion situés à la périphérie de la cellule lactotropes qui libèrent leur contenu le plus rapidement suite à une stimulation. Il y a des cellules lactotropes petites ($1500 \mu\text{m}^2$) et grandes ($3995 \mu\text{m}^2$) (Lledo et al., 1990). L'hétérogénéité morphologique des cellules lactotropes soulève les hypothèses selon lesquelles il peut exister plusieurs sous-populations de cellules lactotropes spécialisées dans la sécrétion d'une forme spécifique de prolactine,

ou bien que toutes les cellules lactotropes possèdent la capacité de sécréter plusieurs formes de prolactine sous différentes conditions physiologiques.

1.2.3 Hétérogénéité fonctionnelle

À l'origine, les cellules lactotropes sont mammosomatotropes c'est-à-dire des cellules qui sécrètent à la fois la prolactine et l'hormone de croissance. Pendant le développement de l'hypophyse chez l'humain (Baker et Yu, 1977), le rat (Watanabe et Daikoku, 1979), la souris (Slabaugh et al., 1982) et le mouton (Parry et al., 1979), l'apparition des cellules somatotrophes (cellules sécrétrices de l'hormone de croissance uniquement) précède souvent celle des cellules lactotropes. De plus, la grande majorité de la progéniture des cellules qui synthétisent la prolactine présente une coexpression transitoire avec l'hormone de croissance. Du développement fœtal à l'âge adulte, les cellules mammosomatotropes sont toujours présentes au niveau de l'hypophyse. Chez le rat mâle adulte normal, le pourcentage de cellules mammosomatotrope varie entre 5 à 35% de la population des cellules hypophysaires totales (Frawley et al., 1985; Leong et al., 1985). La présence de cellules mammosomatotropes à l'âge adulte peut expliquer en partie l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules qui sécrètent la prolactine en réponse à différents stimulus. Ces cellules sont aussi présentes dans plusieurs tumeurs hypophysaires (Halmi, 1982; Horvath et al., 1983). Chez des patients atteints d'acromégalie, au moins le tiers des cellules cancéreuses en culture sécrètent à la fois la prolactine et l'hormone de croissance (Lambert et al., 1985).

L'hétérogénéité fonctionnelle des cellules lactotropes serait associée à la taille des cellules lactotropes. Hymer et al. (1974) ont démontré que les cellules lactotropes peuvent exister selon plusieurs dimensions et que les grosses cellules lactotropes sécrètent plus de prolactine que les petites cellules. Ces auteurs ont aussi démontré que le traitement à l'oestrogène augmente le nombre de grosses cellules lactotropes possédant de gros granules de sécrétion capables de libérer de grandes quantités de prolactine. Les cellules lactotropes qui sécrètent de grandes quantités de prolactine sont plus sensibles au traitement à la dopamine (Luque et al., 1986). Ces résultats suggèrent que la taille des cellules lactotropes indiquerait des sous populations de lactotropes qui réagissent différemment aux facteurs régulateurs de la sécrétion de prolactine.

L'origine de telles différences fonctionnelles parmi les cellules lactotropes est-elle intrinsèque ou extrinsèque ? Jusqu'à maintenant certains auteurs ont démontré que l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules lactotropes pourrait être reliée à des facteurs extrinsèques tel la localisation de ces cellules lactotropes dans l'hypophyse (Sato, 1980). D'autres recherches considèrent plutôt l'hypothèse de facteurs intrinsèques c'est-à-dire le stade fonctionnel de la cellule tel l'existence d'un cycle sécrétoire cellulaire pour expliquer l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules lactotropes. Malheureusement, la question de l'origine de l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules lactotropes demeure encore un sujet peu connu à ce jour.

1.3 Régulation de la sécrétion de prolactine

La régulation de la sécrétion de prolactine *in vivo* implique la participation de facteurs inhibiteurs (PIFs: prolactin-inhibiting factors) et stimulateurs (PRFs: prolactin-releasing factors) provenant surtout de l'hypothalamus (Neil, 1974). Une caractéristique de la sécrétion de prolactine est d'être constamment inhibée, en particulier par la dopamine hypothalamique (Lamberts et Macleod, 1990). En l'absence de cette inhibition, la cellule lactotrope sécrète des taux élevés de prolactine (Denef et al., 1984; Swearingen et al., 1990). La **dopamine**, une substance de la famille de catécholamines, est le plus important facteur inhibiteur de la sécrétion de prolactine (Lamberts et Macleod, 1990; Macleod, 1976). Cependant, d'autres facteurs inhibiteurs tel le GABA, et la calcitonine ont été décrits. Les facteurs stimulant la sécrétion de prolactine sont nombreux, les plus importants sont le VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*) et la TRH (*Thyrotropin-releasing hormone*). L'activation des récepteurs des PRFs et PIFs dans les cellules lactotropes implique plusieurs systèmes de messagers intracellulaires. La régulation de la sécrétion de prolactine par les cellules lactotropes n'est pas simplement la somme algébrique des effets stimulateurs et inhibiteurs des facteurs régulateurs mais un système interactif beaucoup plus complexe.

1.3.1 Contrôle autocrine et paracrine de la sécrétion de prolactine

L'hypophyse antérieure est composée de cinq types de cellules hormonales différentes capables de sécréter plusieurs messagers locaux dont l'action peut affecter leurs propres activités ou celles des cellules voisines. Par exemple, la sécrétion de prolactine est sous le contrôle autocrine et paracrine (Le Roith et al., 1983; Sporn et Todaro, 1980).

La régulation autocrine, bien que participe au contrôle de la sécrétion de prolactine, n'a été démontrée jusqu'à présent que pour une seule substance, le VIP (Arnaout et al., 1986; Besson et al., 1972; Morel et al., 1982; Nicosia et al., 1982). Des études ont démontré que les cellules lactotropes sont capables de synthétiser et de libérer le VIP pour stimuler leur propre sécrétion de prolactine (Nagy et al., 1987).

Jusqu'à ce jour, deux types de cellules hypophysaires, les gonadotropes et les cellules folliculo-stellaires, sont connues pour exercer un contrôle paracrine sur la sécrétion de prolactine. Les cellules gonadotropes en réponse au GnRH (*Gonadotrophin releasing hormone*), libèrent un facteur stimulateur de la sécrétion de prolactine: l'angiotensine II (Denef et al., 1986; Schramme et Denef, 1983; Aguilera et al., 1982). Les cellules folliculo-stellaires, qui expriment la protéine S-100, inhibent la sécrétion de prolactine lorsqu'elles sont co-incubées en culture avec les cellules lactotropes (Baes et al., 1987). Cependant les cellules folliculo-stellaires synthétisent et libèrent l'interleukine 6 et la protéine S-100 qui stimulent toutes les deux la sécrétion de prolactine (Allaerts et al, 1997; Lloyd et Mailloux, 1988). Le Ca^{2+}

intracellulaire joue un rôle important dans l'inhibition de la sécrétion de prolactine induite par les cellules folliculo-stellaires (Shäfer et Heizmann, 1996).

1.3.2 Les facteurs inhibiteurs de la sécrétion de prolactine (PIFs)

Plusieurs hormones et substances inhibent la sécrétion de prolactine, la dopamine étant le principal inhibiteur.

A) La dopamine

La **dopamine**, une substance de la famille des catécholamines, est la principale neurohormone provenant de l'hypothalamus impliquée dans l'inhibition de la sécrétion et de la synthèse de prolactine. La dopamine, la sérotonine, l'histamine, la noradrénaline et l'adrénaline sont des neurotransmetteurs synthétisés à partir d'acides aminés, d'où leur nom d'**amines biogènes**. La dopamine et la noradrénaline sont synthétisées à partir de la tyrosine, un acide aminé, au cours d'un même processus composé de plusieurs étapes. Ainsi, le processus de synthèse s'arrête à l'étape de la dopamine dans les neurones dopaminergiques mais se poursuit jusqu'à l'étape de la noradrénaline dans les neurones noradrénergiques. Les neurones de l'hypothalamus ventral en particulier du noyau arché sont dotés d'axones très courts qui déversent la dopamine dans les capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire. Par cette voie, la dopamine hypothalamique atteint l'adénohypophyse, où elle régit l'activité sécrétrice de plusieurs cellules hormonales parmi lesquels on trouve les lactotropes. La perte de la connexion entre l'hypophyse et l'hypothalamus soit par un dommage à

l'éminence médiane (Bishop et al., 1971), une coupe transversale du système porte hypothalamo-hypophysaire (Gale et al., 1961), ou la greffe de l'hypophyse sous la capsule du rein (Chen et al., 1970; Everett, 1954) induisent tous une hypersécrétion de prolactine. De même, en l'absence de dopamine, les cellules lactotropes en culture augmentent significativement leur sécrétion de prolactine (Denef et al., 1984; Swearingen et al., 1990). Chez le rat, une chute de la concentration de dopamine dans le système porte est surtout observée immédiatement avant une sécrétion massive de prolactine aux derniers jours de grossesse et durant la période de lactation en réponse à l'allaitement (de Greef et al., 1981; de Greef et Visser, 1981). La concentration de dopamine dans le système porte chute de 50-70% suite à la stimulation des glandes mammaires, processus qui stimule l'allaitement (de Greef et al., 1981; de Greef et Visser, 1981; Plosky et Neill, 1982; Mena et al., 1980).

Dans les cellules lactotropes, l'action inhibitrice de la dopamine implique la stimulation des **récepteurs dopaminergiques D2** qui sont des protéines transmembranaires dont le mécanisme d'action est contrôlé par l'interaction avec des protéines G hétérotrimériques inhibitrices (Gi) (Martin et al., 1984). Les récepteurs D2 dopaminergiques sont des récepteurs saturables qui possèdent une grande affinité et démontrent une stéréosélectivité pour les agonistes et antagonistes dopaminergiques (Ben-Jonathan, 1985; Caron et al., 1985). L'apomorphine et les ergots (bromocriptine, lisuride et lergotrile) sont de agonistes dopaminergiques D2. Ils présentent une grande affinité de liaison pour les membranes de cellules hypophysaires et ils sont des

inhibiteurs de la libération de prolactine *in vivo* et *in vitro*. Le spiperone, l'haloperidol et la domperidone sont des exemples d'antagonistes D2. *In vivo*, ils induisent une augmentation de la sécrétion de prolactine. La concentration sanguine de dopamine dans le système porte est suffisante pour occuper au moins 80% des récepteurs dopaminergiques D2 à la surface des cellules lactotropes (Martin et al., 1984). Le degré d'inhibition est proportionnel au taux de récepteurs occupés. Ainsi, lorsque la concentration de dopamine diminue, il en résulte une dissociation rapide de la dopamine des récepteurs D2.

Valiero et al. (1994) suggèrent que la régulation de prolactine médiée par la dopamine implique un autre type de récepteur distinct des récepteur D2, les récepteurs dopaminergiques D4. Ces récepteurs dopaminergiques sont exprimés dans l'hypophyse antérieure (Matsumoto et al., 1995). La structure, la fonction et l'effet pharmacologique des récepteurs D4 sont similaires aux récepteurs D2. De plus, tout comme les récepteurs D2, l'activation des récepteurs D4 inhibe l'activité de l'adénylate cyclase. Cependant, les études *in vitro* de Sanyal et Van Tol (1997) ont démontré que les récepteurs D4 n'ont pas un effet majeur sur la synthèse et la sécrétion de prolactine des cellules somatomammotropes, malgré leur abilité à inhiber la production d'AMPC.

Dans les cellules lactotropes, le mécanisme d'inhibition de la sécrétion et la synthèse de prolactine induit par la dopamine est complexe et implique plusieurs messagers intracellulaires. Les principaux systèmes par lesquels la dopamine induit l'inhibition de la sécrétion de prolactine sont les voies de signalisation intracellulaire de

l'AMPc/ protéine kinase A (PKA) (Taraskevich et Douglas, 1978; Ray et Wallis, 1982), le Ca^{2+} (Ben-Jonathan, 1985) et l'inositol 1,4,5-triphosphate/ protéine kinase C (PKC). Ainsi, l'administration de dopamine diminue l'activité de l'adénylate cyclase à la surface des membranes des homogénats de glandes et de tumeurs hypophysaires et diminue les concentrations intracellulaires d'AMPc de cultures enrichies en cellules lactotropes (DeCamilli et al., 1979; Giannattasio et al., 1981). L'administration d'agonistes dopaminergiques D2 induit les mêmes effets; effets qui sont bloqués par des antagonistes dopaminergiques D2 (DeCamilli et al., 1979; Giannattasio et al., 1981; Swennen et Denef, 1982). Dans les cellules lactotropes, la dopamine inhibe l'adénylate cyclase et diminue les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} , via l'activation des récepteurs dopaminergiques D2 (Canonici et al., 1982; Canonico et al., 1983). Ces données expérimentales montrent que l'AMPc et le Ca^{2+} jouent un rôle très important dans la régulation de la sécrétion et de la synthèse de prolactine par la dopamine.

B) Acide γ -Aminobutyrique (GABA), Somatostatine et GAP (Gonadotropin-Releasing Hormone associated Peptide)

L'acide γ -Aminobutyrique (GABA), la somatostatine et le GAP (*Gonadotropin-Releasing Hormone associated Peptide*) sont toutes des substances qui inhibent la sécrétion de prolactine selon différents mécanismes d'action intracellulaires. **1) Le GABA** à des concentrations élevées inhibe la sécrétion de prolactine par des cellules lactotropes via des récepteurs spécifiques (Lamberts et MacLeod, 1978; Racagni et al., 1979). Les récepteurs GABA sont classés en deux types selon leurs propriétés

pharmacologiques: GABA A et GABA B (Hill et al., 1981). Les récepteurs GABA A sont sensibles au muscimol et ils sont inhibés par la bicuculline. Alors que les récepteurs GABA B sont insensibles à la bicuculline, ils sont sélectivement activés par le baclofen et inhibés par des antagonistes tel le phaclofen, saclofène, 2-hydroxysaclofène, 3-aminopropylphosphonique (Kerr et al., 1987). Le GABA est moins puissant que la dopamine pour inhiber la sécrétion de prolactine (Lamberts et MacLeod, 1978). Certains auteurs suggèrent que le GABA inhibe la sécrétion de prolactine des cellules lactotropes en activant les canaux à voltage dépendant de Cl⁻ des membranes des cellules lactotropes (Inenaga et Mason, 1987; Inenaga et Mason, 1987) et bloque la synthèse de la prolactine en inhibant l'expression et la sécrétion de gènes de prolactine (Lamberts et MacLeod, 1978; Loeffler et al., 1986). Grandison et Guidotti (1979) ont démontré que chez les rats femelles ovariectomisées traitées à l'oestrogène et chez les mâles traités à la morphine, l'administration intraventriculaire ou intrahypothalamique de muscimol, un agoniste de GABA, inhibe l'augmentation des concentrations de prolactine dans le sang. Leur résultats suggèrent que cet effet inhibiteur résulte de la liaison de GABA à ces récepteurs spécifiques (GABA A). Par contre, Ondo et Dom (1986) ont démontré que la microinfusion de muscimol dans l'hypothalamus augmente la concentration de prolactine sécrétée par les cellules lactotropes. Ces résultats suggèrent que le GABA peut régulariser la sécrétion de prolactine via l'hypothalamus. L'administration parentéral de GABA induit la stimulation de la sécrétion de prolactine (Pass et Ondo, 1977). 2) *La somatostatine*, une hormone hypothalamique, inhibe de la sécrétion d'ACTH, de TSH (Yamashiro et

Li, 1973) et de prolactine, mais elle est surtout reconnue comme étant un facteur physiologique important qui inhibe la sécrétion de GH. Chez le rat, la somatostatine inhibe la sécrétion *in vivo* et *in vitro* de GH, alors qu'elle inhibe seulement la sécrétion *in vitro* de prolactine (Brazeau et al., 1973; Drouin et al., 1976). La raison pour laquelle la somatostatine inhibe seulement la sécrétion *in vitro* de prolactine est encore inconnu. Une hypothèse possible est que l'activité de la somatostatine est efficace qu'en l'absence de régulation hypothalamique. Cette inhibition de la sécrétion de prolactine implique la stimulation de récepteurs spécifiques à la somatostatine (Hanew et Rennels, 1982). Dans les cellules hypophysaires de rat, la somatostatine inhibe la production d'AMPC induite par la GH. *In vitro*, l'inhibition de la somatostatine sur la sécrétion de prolactine est beaucoup plus faible que pour le GH. Des études ont démontré que la somatostatine diminue la concentration de prolactine dans le sang de certains patients atteints d'acromégalie (Yen et al., 1974). Dans certains cas, l'inhibition de la sécrétion de prolactine induite par la somatostatine requiert la présence d'estradiol dont le rôle est de sensibiliser les lactotropes à reconnaître la somatostatine. L'estradiol régularise la sensibilité des cellules lactotropes à la somatostatine en augmentant la quantité de ses récepteurs à la somatostatine à la surface des cellules (Kimura et al., 1986). *In vitro*, des concentrations physiologiques croissantes d'estradiol diminuent la sensibilité des cellules lactotropes à la dopamine, alors que leur sensibilité à la somatostatine augmentent (Lamberts et al., 1989). **3) Le GAP** est un peptide synthétisé dans l'hypothalamus et transporté vers l'hypophyse via le système porte. Le GAP inhibe la sécrétion de prolactine via des facteurs

membranaires spécifiques (Dhariwal et al., 1968; Khoram et McCann, 1986; Kuhn et al., 1974; McCann et al., 1984; Mizunuma et al., 1985; Takahara et al., 1974). Dans les cellules lactotropes, l'activation des récepteurs spécifiques de GAP diminue les concentrations intracellulaires d'AMPc. Des études ont démontré qu'une concentration de 10^{-10} M de GAP inhibe la sécrétion de prolactine dans 45% des cellules lactotropes, ceci suggère que GAP est un PIF encore plus puissant que la dopamine (Lamberts et MacLeod, 1990). Dans les cellules de rats normaux, l'administration *in vivo* et *in vitro* de GAP n'inhibe pas la sécrétion de prolactine (Millar et al., 1986). En effet, McCann et col. (1988) ont démontré que chez le rat, l'administration *in vivo* de GAP inhibe la sécrétion de prolactine dans des conditions spécifiques tel la lactation et le stress. Dans des conditions de prolactinémie, le GAP n'affecte pas la libération de prolactine des cellules lactotropes humaines (Ishibashi et al., 1987).

1.3.3 Les facteurs stimulateurs de la sécrétion de prolactine (PRFs)

La sécrétion de prolactine par les cellules lactotropes est stimulée lors de la lactation (Neil, 1974), en réponse à différentes formes de stress (Neil, 1970) et par les hormones ovariens, en particulier l'estrogène (Neil, 1974). Cette stimulation de la sécrétion de prolactine est certainement associée à une décroissance passagère de la libération de facteurs inhibiteurs hypothalamiques, en particulier la dopamine, dans le système porte. Cependant, ce sont surtout les facteurs stimulateurs de la sécrétion de prolactine qui sont responsables de l'augmentation de la libération de l'hormone. Les

facteurs stimulateurs de la sécrétion de prolactine sont nombreux, les plus importantes sont la TRH (*Thyrotropin-releasing hormone*) et le VIP (*Vasoactive intestinal peptide*). Les autres facteurs stimulateurs de la sécrétion de prolactine connus à ce jour sont l'ocytocine, les β -endorphines (Enjalbert et al., 1979; Grandisson et Guidotti, 1977), le met-enkephaline (Enjalbert et al., 1979; Lien et al., 1976), la leu-enkephaline (Enjalbert et al., 1979; Lien et al., 1976), la neurotensine (Enjalbert et al., 1982; Vijayan et McCann; 1979), la bombésine (Westendorf et Schonbrunn, 1982), le GnRH (Denef, 1981), l'angiotensine II (Steele et al., 1981, Scramme et Denef, 1983), la vasopressine (Jonhson et al., 1980), la substance P (Vijayan et al., 1979; Kato et al., 1976), le facteur de croissance épithéliale (Jonhson et al., 1980; Schonbrunn et al., 1980), le facteur de croissance des fibroblastes (Jonhson et al., 1980; Schonbrunn et al., 1980), le cholecystokinine (Vijayan et McCann, 1979), le peptide PHI-27 (Hokfelf et al., 1983), le bradykinine (Jones et al., 1987), la neurophysine II (Shin et al., 1985), la leumorphine (Tojo et al., 1985), l' α -néoendorphine (Matsushita et al., 1982), la dynorphine (Matsushita et al., 1982), et la sous-unité α de LH (Begeot et al., 1983). Tous ces facteurs stimulent la sécrétion de prolactine par des cellules lactotropes via différents mécanisme d'actions qui impliquent plusieurs systèmes et messagers intracellulaires.

A) Le VIP (*Vasoactive intestinal peptide*)

Le VIP (*Vasoactive intestinal peptide*) est un peptide qui induit la stimulation de la sécrétion de prolactine via des récepteurs membranaires spécifiques de la famille des

serpentine (Abe et al., 1985; Bataille et al., 1979; Bjoro et al., 1987). Le VIP est un peptide synthétisé dans l'hypothalamus et transporté vers l'hypophyse via le système porte. Dans la circulation sanguine porte, le VIP est présent à des concentrations suffisantes pour stimuler la sécrétion de prolactine (Said et Potter, 1979; Shimatsu et al., 1981). L'activation de ces récepteurs à VIP dans les lactotrope stimule l'adénylate cyclase et donc augmente la concentration intracellulaire d'AMPc (Ruberg et al., 1978; Robberecht et al., 1979; Enjalbert et al., 1980). L'administration de GTP et d'analogues de GTP amplifie la production d'AMPc par VIP ce qui suggère l'implication de protéines G (Robberecht et al., 1979). Le VIP n'affecte pas la production d'inositol phosphates (Sutton et Martin, 1982), mais elle augmente les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} (Pryor-jones et al., 1987). La stimulation de la sécrétion de prolactine induite par VIP n'est pas immédiate, elle est retardée et progressive (Bjoro et al., 1990; Martinez de la Escalera et al., 1988).

Le VIP est aussi synthétisé dans l'hypophyse antérieure par une sous population de cellules lactotropes, il exerce donc en même temps un contrôle autocrine et paracrine dans la régulation de la sécrétion de prolactine (Arnaout et al., 1986). Le VIP synthétisé par ces cellules lactotropes stimule la production de galanine qui à son tour stimule la sécrétion de prolactine dans d'autres cellules lactotropes.

B) La TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone)

La TRH (*Thyrotropin-Releasing Hormone*) est un tripeptide dont la forme structurale est: L-pyroglutamyl-L-histidil-L-proline amide. La TRH est synthétisée dans

l'hypothalamus et transportée vers l'hypophyse via le système porte. Tout comme le VIP, la TRH induit la stimulation de la sécrétion de prolactine par les cellules lactotropes via des récepteurs membranaires spécifiques de la famille des serpentines (Straub et al., 1990). La stimulation de ces récepteurs induit une augmentation rapide des concentrations d'inositol triphosphates et de diacylglicérol (Rebecchi et Gershengorn, 1983; Rebecchi et al., 1983). La TRH augmente aussi les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} , en stimulant la libération du Ca^{2+} de dépôts intracellulaires sensibles à l'IP3 (Drummond et al., 1984; Kolesnick et Gershengorn, 1984; Martin, 1983). Dans le système porte, les concentrations de TRH sont élevées lorsque la sécrétion de prolactine est élevée comme dans le cas de la lactation (de Greef et Visser, 1981; fink et al., 1982). Contrairement au VIP, la stimulation de la sécrétion de prolactine induite par la TRH est extrêmement rapide, en quelques secondes les cellules lactotropes libèrent la prolactine et la transcription de nouvelle prolactine débute environ 2 minutes plus tard (Kolesnick et Gershengorn, 1984). La TRH est aussi synthétisée dans l'hypophyse antérieure (Burhn et al., 1991). Cette TRH pourrait participer au contrôle intrahypophysaire de la sécrétion de la prolactine. Lors de la régulation de la sécrétion de prolactine, les actions stimulantes de VIP et TRH peuvent être additives, puisque ces deux hormones utilisent des voies de signalisation intracellulaires différentes (Enjalbert et al., 1980).

2. RÔLE DU CYTOSQUELETTE DANS LA SÉCRÉTION HORMONALE

Le cytosquelette est impliqué dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tel la motilité, la migration, le transport intracellulaire de particules, la mitose et la méiose, la forme cellulaire, la distribution spatiale des organelles, l'exocytose et l'endocytose, et les communications intra et intercellulaires (signaux électriques, synthèse de protéines et localisation des ARNm) (Trifaró et Vitale, 1993). Le cytosquelette est formé par: *les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires*. Chaque type de filament est constitué à partir d'un monomère protéique différent et peut être assemblé en différentes structures en fonction des protéines qui lui sont associées.

L'activité sécrétrice des cellules implique une réorganisation et des changements dynamiques du cytosquelette. La dynamique du cytosquelette dépend de l'assemblage / désassemblage des filaments et l'organisation spatiale des fibres cytosquelettiques. Ces phénomènes dépendent de l'interaction du cytosquelette avec des protéines de réticulation, d'ancrage, de formation de faisceau, de liaison aux monomères, de fragmentation et de stabilisation; et de l'interaction de ces protéines avec des éléments intracellulaires tel l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique rugueux et les granules de sécrétions, et avec des éléments de la membrane plasmique tel les protéines membranaires et récepteurs hormonaux et avec la matrice extracellulaire. La majorité des hormones peptidiques tel la prolactine sont synthétisées sur les polyribosomes du réticulum endoplasmique. Par la suite, elles sont transférées à l'appareil de Golgi pour y être emmagasinées dans des granules de

sécrétion, puis transportées à la membrane plasmique et sécrétées par exocytose. Les microtubules et les microfilaments sont les éléments majeurs du cytosquelette impliqués dans le transport et l'exocytose des granules de sécrétion. Les microtubules jouent un rôle majeur dans le transport des granules de sécrétion de l'appareil de Golgi à la zone périphérique de la cellule (Karecla et Kreis, 1992). Alors que le cytosquelette cortical d'actine aurait deux effets. Il est en charge du transport de vésicules de sécrétion depuis les microtubules jusqu'à la membrane plasmique et il agit comme une barrière physique aux mouvements des granules de sécrétion, bloquant ainsi leur accès aux sites de l'exocytose (Cheek et Burgoyne, 1986; Perrin et Aunis, 1985).

A) Les microtubules

Les microtubules jouent un rôle très important dans la distribution et la motilité cellulaire et ils sont les principaux éléments structuraux du fuseau mitotique. Les microtubules (PM du dimère de tubuline 110 kDa) sont de longues fibres d'environ 24nm de diamètre. Les microtubules sont composés par deux sous-unité protéiques: la tubuline α et β . Toutes les deux ont un poids moléculaire de 55 kDa. Lorsque des molécules de tubuline s'assemblent en microtubules, elles forment des «protofilaments» linéaires, la sous-unité de tubuline β d'une molécule de tubuline étant en contact avec la sous-unité de tubuline α de la suivante. Dans une microtubule complet, il y a 13 protofilaments disposés côte à côte autour d'une région centrale. Les microtubules sont une structure polaire avec une extrémité plus (à croissance rapide) et une extrémité moins (à croissance lente). Les microtubules s'allongent par

l'addition réversible de sous-unités, qui s'accompagne de l'hydrolyse d'un nucléotide (GTP à GDP) et d'un changement de conformation. L'hydrolyse de GTP se produit seulement après polymérisation de chaque sous-unité, cela implique que les sous-unités liées au GTP ne sont présentes qu'au niveau de l'extrémité en croissance (+) d'un microtubule. Les extrémités (+) des microtubules passent spontanément d'une croissance rapide à un état de rapide raccourcissement. À tout instant, la population de microtubules est par conséquent composée de deux types de polymères, qui ne sont que lentement interchangeables.

Les microtubules jouent un rôle important dans la sécrétion hormonale. Jusqu'à présent, certaines études suggèrent que le réseau de filaments formé par la polymérisation des microtubules est responsable de diriger le mouvement des granules de sécrétion de l'intérieur de la cellule vers la périphérie de la cellule (Ravindra et Grosvenor, 1990). Dans la cellule, le mouvement des organelles sur les microtubules nécessitent la présence de protéines moteurs tel dynéine et de kinésine (Paschal et al., 1987; Brady, 1985). Dans les axones, la kinésine et la dynéine cytoplasmique hydrolysent l'ATP afin de faire circuler des vésicules dans des directions opposées le long des microtubules (Vale, 1987). Les mouvements se produisent à des vitesses de 0. À $2\mu\text{m}$ / seconde, sans les interruptions ni les hésitations caractéristiques observées dans l'axone intacte. Allen et Vale (1996) ont démontré que dans les extraits d'oeufs de *Xenopus*, le cycle cellulaire de la phosphorylation de dynéine régularisent le transport d'organelles, ceci en modulant l'association de la protéine aux membranes. Ces résultats expérimentaux suggèrent que dans les cellules sécrétrices, le transport

des vésicules de sécrétion impliquerait aussi la participation de protéines moteurs.

Les microtubules jouent un rôle important dans la sécrétion de prolactine (Martinez de la Escalera et Weiner, 1992). La dépolymérisation des microtubules par la colchicine (un alcaloïde végétal) inhibe la sécrétion de prolactine (MacLeod et al., 1973). Des études ultrastructurales ont démontré que dans les cellules lactotropes une grande quantité de microtubules sont présent dans la région de l'appareil de Golgi, associée et située autour des citernes, des vésicules et granules de sécrétion. Les microtubules entourent aussi les mitochondries, l'enveloppe nucléaire et les granules de sécrétions matures (Warchol et al., 1975). Dans les cellules lactotropes de rat en lactation, les microtubules sont beaucoup plus nombreux que dans les cellules lactotropes d'un rat normal non lactante (Shiino et al., 1974). Matsuno et al. (1997) ont démontré que l'expression de protéines associées aux microtubules (MAP) est impliquée dans la prolifération cellulaire, les changements ultrastructuraux de l'appareil de Golgi, et la synthèse et le transport des molécules de prolactine. Leurs résultats démontrent que l'inhibition de la sécrétion de prolactine induit par la dopamine ou la bromocriptine, décroît l'expression de MAPs tel MAP-2 et tau. L'effet contraire se produit lors de la sécrétion de prolactine, les microtubules se polymérisent et l'expression de MAP-2 augmente. MAP-2 est une protéine qui fait saillie sur les microtubules et stimule leur polymérisation. Le domaine en saillie de MAP-2 fixe les protomères régulateurs d'une protéine kinase AMPc-dépendante et possède des sites phosphorylés; le domaine de MAP-2 qui s'attache au microtubule fixe la calmoduline

et possède des sites phosphorylés. Tau est une protéine oligomérique formée de trois à six polypeptides. Comme MAP-2, tau possède des sites de phosphorylation et fixe la calmoduline. Tau collaborerait à l'initiation de la polymérisation du microtubule. Martinez de la Escalera et Wiener (1992) ont démontré que l'incubation des cellules lactotropes incubées dans un milieu de culture avec la TRH stimule la sécrétion de prolactine et la phosphoryle plusieurs MAPs tel MAP-2. Ces résultats suggèrent que la dopamine supprime la phosphorylation de MAP et inhibe la sécrétion de prolactine.

B) Les Microfilaments d'actine

L'actine est la protéine intracellulaire prépondérante dans la cellule eucaryote. Dans les cellules musculaires, l'actine compte pour 10 % et, dans les autres cellules, de 1 à 5% de la quantité totale de protéine cellulaire. L'actine se présente sous forme de monomère globulaire appelé *actine-G* de 42 kDa de masse moléculaire et sous forme de polymère appelé *actine-F* (actine filamenteuse), formé d'une chaîne de monomères d'actine-G. Les monomères globulaires d'actine s'associent en filaments en présence de Mg^{2+} et de K^+ ou Na^+ à des concentrations semblables à celles du cytosol. Comme les microtubules, les filaments d'actine grandissent par apport de monomères à leur deux bouts. Les monomères d'actine fixent fermement soit un ATP, soit un ADP (le monomère de tubuline fixe GTP ou GDP). Les monomères d'actine portant un ATP s'associent au filament d'actine plus rapidement que ne le font les monomères garnis d'ADP. Peu après la polymérisation en actine F, l'ATP lié s'hydrolyse en ADP, une

hydrolyse qui n'est pas indispensable à la polymérisation. La vitesse de croissance des filaments d'actine purifiée est 5 à 10 fois plus élevée au bout (+) qu'au bout (-). Environ 50% des molécules d'actine dans la majorité des cellules animales ne sont pas polymérisées, existant sous la forme de monomères libres (actine-G) ou de petits complexes avec d'autres protéines. Dans le milieu intracellulaire, la présence de nombreux protéines de liaisons aux monomères tel la colfiline, la profiline et la thymosine β_4 , empêche la polymérisation d'un certain pourcentage d'actine-G. Un équilibre dynamique existe entre ce pool de molécules d'actine non polymérisées et les filaments d'actine, ce qui facilite de nombreux mouvements de la surface des cellules et de structures à l'extérieur de la cellule.

Depuis quelques années, les données expérimentales indiquent un rôle du cytosquelette d'actine dans les mécanismes de sécrétion. La dépolymérisation des filaments d'actine par des substance comme la cytochalasine D provoque la stimulation de sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (Orci et al., 1972) et de catécholamines par les cellules chromaffines de la surrénales (Lelkes et al., 1986). Des études biochimiques et de microscopie à fluorescence ont démontré que la sécrétion d'hormones et de neurotransmetteurs induit un désassemblage rapide, réversible et transitoire des filaments d'actine (Cheek et Burgoyne, 1986; Trifaró et al., 1989), et que les régions d'exocytose sont dépourvues d'actin- F (Vitale et al., 1991; Nakata et Hirokawa, 1992). Trifaró et Vitale (1993) ont démontré que dans les cellules sécrétrices, le cytosquelette cortical d'actine agit comme barrière physique aux mouvements des granules de sécrétion. Dans les cellules chromaffines, les vésicules de

sécrétion sont associées aux filaments d'actine par des protéines d'ancrage tel l' α -actinine (Trifaró et al., 1984) et la fodrine (Aunis et Perrin, 1984). Cela permet la formation de liens croisés entre les vésicules et les filaments d'actine (Trifaró et al., 1984; Fowler et Pollard, 1982) et empêche les vésicules de sécrétion d'atteindre les sites d'exocytose à la membrane plasmique (Trifaró et al., 1984). Lors de la sécrétion, le réseau de filaments d'actine dans la région de la membrane plasmique se désassemble pour permettre aux granules de sécrétion d'atteindre la membrane plasmique et engendrer l'exocytose (Cheek et Borgoyne, 1986; Vitale et al., 1991; Trifaró et al., 1989). Dans des études récentes (Carbajal et Vitale, 1997), notre laboratoire a démontré l'importance du cytosquelette d'actine dans la sécrétion de prolactine. Dans les cellules lactotropes hypophysaires, le désassemblage du cytosquelette cortical d'actine est suffisant pour stimuler la sécrétion de prolactine. Ceci est très intéressant puisque dans la plupart des cellules dont la participation du cytosquelette d'actine est étudiée à l'exception des cellules pancréatiques, le désassemblage des filaments d'actine n'est pas suffisant pour induire la sécrétion. L'effet contraire c'est-à-dire, le réassemblage du cytosquelette cortical se produit lors d'une inhibition de la sécrétion de prolactine. En effet, l'incubation des cellules lactotropes en cultures avec de la dopamine mène au réassemblage et la stabilisation des filaments corticaux d'actine. Cela suggère que la stabilisation du cytosquelette cortical d'actine ferait partie des mécanismes impliqués dans l'inhibition de la sécrétion de prolactine par la dopamine (Carbajal et Vitale, 1997). Ceci a été confirmé par le fait

que la dopamine inhibe la stimulation de sécrétion de prolactine induit par la cytochalasine D (Carbajal et Vitale, 1997).

La polymérisation, stabilisation et l'organisation spatiale des filaments d'actine impliquent la participation de plusieurs types de protéines de liaisons parmi lesquelles on trouve les protéines de réticulation (filamine), de formation de faisceau (fimbrine et fascine), d'ancrage (fodrine, taline, vinculine, dystrophine, ankyrine et α -actinine), de liaison aux monomères (cofiline et profiline), de fragmentation (gelsoline, villine et scindérine) et de stabilisation (gelsoline, villine, capz et adf). L'assemblage et le démantèlement des filaments d'actine dans les cellules sont ajustés par des protéines qui se lient à l'actine. Certaines, comme la profiline, séquestrent les monomères d'actine, empêchant leur incorporation à l'actine-F. D'autres protéines, telles la gelsoline, la sévérine et la villine, s'attachent à l'extrémité barbue des filaments d'actine et empêchent toute polymérisation de progresser à cette extrémité des filaments; en outre beaucoup de ces protéines scindent l'actine-F. La réorganisation du cytosquelette d'actine lors de la régulation de la sécrétion implique la participation de protéines régulatrices associées au cytosquelette d'actine. Jusqu'à présent, des études ont démontré que la fodrine, une protéine d'ancrage (Perrin et Aunis, 1985), et la scindérine, une protéine de réticulation (Vitale et al., 1991), se redistribuent et colocalisent sur les filaments d'actine durant la stimulation de la sécrétion. Dans les cellules pancréatique acineuse, l'introduction de protéines de liaisons aux monomère d'actine induit le désassemblage des filaments d'actine et augmente la libération d'amylase (Muallem et al., 1995). De même, dans les cellules chromaffines sécrétrices

le désassemblage du réseau cortical d'actine facilite l'accès des granules de sécrétion à la membrane plasmique, augmentant ainsi la sécrétion de catécholamines (Vitale et al., 1995). Tous ces résultats suggèrent que les filaments d'actine jouent un rôle important dans l'inhibition de la sécrétion.

C) Les Filaments Intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des fibres protéiques résistantes et stables situées dans le cytoplasme de la majorité des cellules eucaryotes supérieurs. Organisés comme des cordages, ils ont un diamètre caractéristique de 8 à 10 nm; leur diamètre est intermédiaire entre les filaments d'actine et les microtubules. Contrairement à l'actine et à la tubuline, qui sont des protéines globulaires, les sous-unités des filaments intermédiaires sont des protéines fibreuses. Ces molécules protéiques allongées s'associent côte à côte en des rangées superposées pour forer de long filaments possédant une résistance élastique élevée. En fonction de leur composition protéique et de leur distribution dans différents types de cellules, les filaments intermédiaires ont été regroupés en 5 classes: 1) et 2) *les kératines*: protéines structurales principales de la peau, des poils, de la laine, des plumes et des ongles, 3) *les filaments de desmine*: associés aux cellules musculaires cardiaques et squelettiques; *les filaments intermédiaires des cellules gliales et la vimentine*: intervient dans le maintien de la forme cellulaire et la positionnement des noyaux au sein de la cellule, 4) *les neurofilaments intermédiaires*: prépondérants des neurones et comportent un trio de protéines de poids moléculaires de 110, 102 et 62 kDa; 5) *les laminines nucléaires*.

Les polymères de filaments intermédiaires sont des structures très stables pouvant résister à des solutions salines de forte ou faible force ionique ou à des détergents non ioniques. Ils sont particulièrement importants là où les cellules sont soumises à une contrainte mécanique, comme dans les épithélium, là où ils sont reliées de cellule en cellule au niveau des desmosomes, le long des axones, et à travers tout le cytoplasme des cellules du muscle lisse.

Les filaments intermédiaires cytoplasmique s'étendent de l'enveloppe nucléaire vers la périphérie cellulaire. Ils sont impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires incluant des rôles dans le support mécanique de la cellule et du noyau, et dans la forme cellulaire (Golman et Knipe., 1973). Les chocs thermiques (Welch et Suhan, 1985), les facteurs de croissance induisant la phosphorylation (Baribault et al., 1989) et l'association avec des protéine kinases C en réponse à un signal à la surface cellulaire (Spudich et al., 1992) provoquent des changements biochimiques et une réorganisation des filaments intermédiaires. Le désassemblage des microtubules et des microfilaments par des substances tel la colchicine ou la cytochalasine D induit aussi le réarrangement des filaments intermédiaires. Cela implique que les filaments intermédiaire interagissent avec les microtubules et les microfilaments lors de changement morphologique de la cellule. Cependant, le rôle des filaments intermédiaires dans la sécrétion n'est pas encore connu.

Matériels et méthodes

Culture cellulaire et purification de lactotropes

Nous avons utilisé des rats femelles adultes, à différents stades du cycle ovarien, pour prélever le lobe antérieur de l'hypophyse. Pour la culture cellulaire, le pool tissulaire est formé de 4-10 hypophyses antérieures. Nous plaçons les hypophyses antérieures dans une solution de Locke sans Mg^{2+}/Ca^{2+} (154 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 2.15 mM K_2HPO_4 , 0.85 mM KH_2PO_4 , 10 mM HEPES, 10 mM glucose; pH 7.2), et à l'aide d'un ciseau nous coupons les hypophyses antérieures en petits morceaux. Par la suite, nous incubons les morceaux de tissu dans la solution de Locke contenant 0.1% de trypsine, 0.21% de collagénase D et 0.3% de BSA. L'incubation se poursuit à 37°C pendant 2-3 heures afin de bien digérer les tissus. Pour arrêter la digestion, nous ajoutons un volume de *Dulbecco's modified essential medium* (DMEM) contenant 0.2% de l'inhibiteur de trypsine. Cette procédure nous permet d'obtenir une population mixte de cellules hypophysaires. Les cellules sont rincées avec le milieu DMEM et mises dans le milieu de culture (DMEM complété avec 2.5% de sérum foetal bovin, 10% de sérum de cheval et 2.5 mg /100 mL de nystatine, 5000 U /100 mL de gentamycine, 10 mg /100 mL de pénicilline et 10 mg /100 mL de streptomycine). Les cellules sont déposées sur des lamelles recouvertes de poly-L-lysine dans le cas d'études en microscopie à fluorescence. Pour les études biochimiques, les cellules sont placées sur des boîtes de Pétri en plastique de 35mm de diamètre. Les cellules sont cultivées à 37°C dans un atmosphère 95% air- 5% CO_2 .

Nous avons travaillé dans certains cas avec une population enrichie en cellules lactotropes. Comme l'hypophyse antérieure possède six sortes de cellules, nous avons effectué une séparation des différents types cellulaires à l'aide d'un gradient discontinu de Percoll (Velkeniers et al., 1988). Le gradient est préparé en plaçant des solutions de différentes densités en ordre décroissant (70, 60, 50, 35 et 25%) dans des tubes de 15 mL (graphique 1). Ainsi, après la digestion enzymatique, nous plaçons toute la population des cellules hypophysaires en haut du gradient. Nous plaçons de 2×10^6 à 8×10^6 cellules par gradient. Par la suite nous soumetons le gradient à une centrifugation pendant 12 minutes à 15000 g. La fraction enrichie en cellules lactotropes est située à l'interphase des couches 35-50% (figure 1).

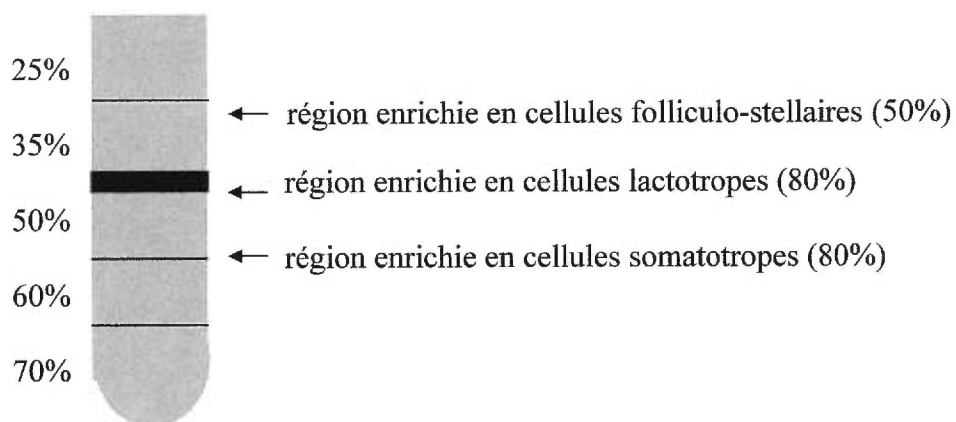


Figure 1: Séparation de la population mixte de cellules hypophysaires en couches enrichies en certains types de cellules hypophysaires à l'aide d'un gradient de Percoll.

Une culture mixte de cellules hypophysaires comprend normalement 40% de cellules lactotropes. Dans le cas d'une culture enrichie en lactotropes, cette proportion augmente à 80%. La fraction enrichie en cellules lactotropes est mise en culture tel que décrit pour la population mixte de cellules hypophysaires.

Immunfluorescence

Les cellules hypophysaires ou les cellules lactotropes sont déposées sur des lamelles recouvertes de poly-L-lysine à une densité de 2×10^5 cellules/ lamelle. Avant de débiter un traitement quelconque, nous laissons les cellules s'attacher aux lamelles pendant 24 heures. De plus, cette période permet aux cellules de récupérer leurs récepteurs de membrane. Les cellules sont ensuite incubées en présence de divers substances (temps d'incubation et concentrations selon le protocole correspondant). Il est à noter que chaque fois que nous traitons les cellules avec la dopamine, nous ajoutons $100 \mu\text{M}$ d'acide ascorbique au milieu de culture afin d'éviter l'oxydation et l'inactivation de la dopamine. Après les traitements, nous enlevons les cellules de l'incubateur et nous débutons l'expérience en rinçant à plusieurs reprises les cellules avec une solution de Locke (154 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 0.85 mM KH_2PO_4 , 2.15 mM K_2HPO_4 , 10 mM HEPES: pH 7.2, 10 mM glucose, 0.1 M MgCl_2 , 0.1 M CaCl_2). Après les rinçages, nous fixons les cellules avec une solution de 3.7% de formaldéhyde dans la solution de Locke. Il est à noter que lorsque nous traitons les cellules avec une certaine substance, la solution de Locke et la solution de formaldéhyde contiennent la même substance à la même

concentration que lors du traitement. Nous perméabilisons ensuite les cellules avec une série de traitements à l'acétone (3 min acétone 50%, 3 min acétone 100%, 3 min acétone 50%) (Lee et Trifarò, 1981). Nous rinçons les cellules avec du PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) et nous incubons ensuite les cellules pendant une heure dans le BLOTTO (3% de lait écrémé en poudre dans du PBS) afin de bloquer les sites de marquage non spécifiques. Nous avons utilisé la microscopie à fluorescence pour 1) identifier les différents types cellulaires de l'hypophyse antérieure; 2) effectuer des études dose-réponse et cinétiques de l'effet de la dopamine sur la morphologie des cellules hypophysaires (lactotropes et non-lactotropes); 3) localiser les différentes protéines associées au cytosquelette d'actine des cellules lactotropes (Carbajal et Vitale, 1998).

1) Identification des différents types cellulaires de l'hypophyse antérieure.

Nous avons marqué les cellules avec des anticorps spécifiques pour identifier les différents types cellulaires présents dans le lobe antérieur de l'hypophyse. En effectuant un double marquage avec la phalloïdine-rhodamine, qui marque les filaments d'actine, nous avons pu visualiser l'ensemble des cellules.

Après le blocage des sites non spécifique avec le BLOTTO, nous avons incubé les cellules pendant 60 minutes à 37°C avec l'un des anticorps suivants dilués dans du PBS 1%-lait: anti-PRL produit chez le lapin (dilution 1/1000), anti-GH produit chez le singe (dilution 1/20000), anti-ACTH produit chez le lapin (dilution 1/800), anti-LH produit chez le cochon d'inde (dilution 1/15000), anti-TSH produit chez le lapin

(dilution 1/50) et anti S-100 produit chez le lapin (dilution 1/400). Après plusieurs lavages au PBS, nous avons incubé les cellules, pendant 60 minutes à 37°C, avec un deuxième anticorps dirigé contre les immunoglobulines de l'animal chez lequel le premier anticorps est produit, couplé à la fluorescéine (FITC) tous dilués 1/400-1/500 dans le PBS-lait 1%). Par la suite, nous avons rincé les lamelles au PBS et nous les avons incubées à la noirceur pendant 45 minutes à la température de la pièce avec la rhodamine-phalloïdine (1/200) afin de visualiser le cytosquelette d'actine (Vitale et al., 1991). Nous avons observé les cellules avec un microscope à fluorescence (Leitz Ortholux II) équipé d'un filtre-I pour la fluorescéine et un filtre-M pour la rhodamine. Dans le cas où nous avons effectué un double marquage des cellules afin d'identifier les cellules somato-lactotropes, nous avons incubé les cellules avec les différents anticorps dans l'ordre suivant: 1) anti-PRL produit chez le lapin (dilution 1/1000); 2) anti-IgG de lapin couplé au tétraméthylrhodamine isothiocyanate (TRITC; dilution 1/200) produit chez la chèvre; 3) anti-GH produit chez le singe (dilution 1/20000); 4) anti-IgG de singe couplé à la fluorescéine (dilution 1/400) produit chez le lapin.

Pour évaluer le pourcentage de chaque type cellulaire présent à l'intérieur d'une culture hypophysaire, nous avons compté les cellules marquées à la fluorescéine (égal un type de cellule hormonale) versus les cellules marquées à la rhodamine-phalloïdine (toutes les cellules). Par cette méthode, nous avons analysé 100 cellules marquées à la rhodamine-phalloïdine par lamelle et classifié ces cellules comme étant positives ou négatives pour le marquage à l'anticorps dirigé contre une

hormone hypophysaire en particulier. Nous avons ainsi calculé le pourcentage des cellules qui synthétisent et sécrètent une hormone hypophysaire dans nos cultures. Pour chaque type cellulaire, chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes (tableau 1).

Tableau I: Pourcentage de chaque type cellulaire retrouvé dans une culture mixte de cellules hypophysaires

Nous avons incubé des cellules hypophysaires et des cellules provenant de la fraction enrichie en lactotrope pendant 48 heures. Ensuite, nous avons marqué les cellules avec des anticorps anti-PRL, anti-GH, anti-ACTH, anti-LH, anti-TSH et anti-S-100 pour identifier les différents types cellulaires. Par un double marquage à la phalloïdine-rhodamine, qui marque les filaments d'actine, nous avons visualisé toutes les cellules. Nous avons classifié les cellules marquées positivement pour un type cellulaire versus l'ensemble des cellules. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et calculé le pourcentage de chaque type cellulaire. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (60-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures cellulaires différentes. Les valeurs montrées correspondent à la moyenne \pm l'écart-type:

Type cellulaire	% de cellules
Lactotropes (PRL)	40.0 \pm 2.0%
Somatotropes (GH)	53.8 \pm 8.4%
Gonadotropes (LH)	3.2 \pm 1.5%
Corticotropes (ACTH)	10.3 \pm 0.3%
Thyréotropes (TSH)	2.8 \pm 0.6%
S-100	16.0 \pm 2.4%
Somatolactotropes (GH/PRL)	51.0 \pm 2.5%**

** sur total des cellules

Tableau II: Pourcentage de chaque type cellulaire issue d'une séparation de la population mixte de cellules hypophysaires en couches enrichies à l'aide d'un gradient de Percoll

Un gradient discontinu de Percoll sépare une suspension de cellules hypophysaires selon leur densité en six fractions cellulaires (I, II, III, IV, V et VI). Après la séparation, nous avons récupéré les différentes fractions et nous avons incubé les cellules. Par immunocytochimie, nous avons marqué les cellules avec des anticorps anti-PRL, anti-GH, anti-ACTH, anti-LH et anti-TSH pour identifier les différents types cellulaires. La fraction I représente la couche de cellules qui n'est pas rentrée dans le gradient discontinu de Percoll. La fraction II représente la couche de cellules qui se retrouve entre les densités 25 et 35%; la fraction III est la couche de cellules qui se retrouve entre les densité 35 et 50%; la fraction IV est la couche de cellules qui se retrouve entre les densité 50 et 60%; la fraction V est la couche de cellules qui se retrouve entre les densité 60 et 70%; alors que la fraction VI est la couche de cellules qui se retrouve au fond du gradient.

	Fraction I	FractionII	FactionIII	FracionIV	Fraction V	FractionVI
PRL	7.0 ±1.2%	58.0±4.3%	80 ±4.4%	15.4±3.1%	6.4±1.3%	15.3±2.4%
GH	20.0±4.3%	4.1 ±1.1%	16.7±2.9%	74 ±6.1%	91.5±5.1%	70.2±1.1%
LH	5.0 ±1.2%	1.0 ±0.2%	11 ±3.1%	3.0 ±.9%	0.0	3.0±0.5%
ACTH	0.0	1.8 ±0.4%	5.0±1.1%	5.0 ±1.1%	1.0±0.2%	0.0
TSH	1.8 ±0.2%	5.2 ±1.4%	2.0±0.4%	4.1 ±0.5%	3.2±1.1%	0.0

2) Études des changements morphologiques des cellules lactotropes lors de la stimulation/ inhibition de la sécrétion de prolactine.

Pour étudier les changements de la forme cellulaire des cellules lactotropes (PRL+) et non-lactotropes (PRL-) lors de l'inhibition/ stimulation de la sécrétion de prolactine, nous avons réalisé un double marquage des cellules pour les identifier comme lactotropes et pour observer leur cytosquelette d'actine. Pour ce faire, après le blocage des sites non spécifiques, nous avons marqué les cellules avec des anticorps anti-PRL suivi d'un deuxième anticorps anti IgG de lapin couplé à la fluorescéine pour identifier les lactotropes; pour visualiser simultanément la forme cellulaire et le cytosquelette des lactotropes, nous avons aussi marqué les cellules avec de la phalloïdine-rhodamine une substance qui ne marque que les filaments d'actine (Vitale et al., 1991). Pour évaluer l'impact des traitements sur la morphologie des cellules, nous avons classifié les cellules hypophysaires lactotropes (PRL+) et non-lactotropes (PRL-) selon leur forme, ronde ou polygonale (voir figure 2). Nous avons classifié 100 cellules par lamelle et nous avons calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes.

3) Localisation des différentes protéines associées au cytosquelette d'actine dans les cellules lactotropes.

La perméabilisation des cellules diffère quelque peu de notre protocole initiale. Ainsi après la fixation, nous avons rincé les cellules avec du PBS (2x 5 minutes), nous les avons lavées durant 15 minutes au PBS-glycine 0.1M et nous les avons rincées de nouveau au PBS (2x 5 minutes). Les cellules ont été ensuite perméabilisées dans une solution de PBS contenant 0.1% de Triton X-100 pendant 10 minutes. Pour marquer et localiser les protéines associées au cytosquelette d'actine dans les cellules lactotropes, nous avons réalisé un double marquage des cellules pour identifier simultanément les lactotropes (PRL+) et la protéine que l'on désire marquer. Ainsi après le blocage, nous avons incubé les cellules pendant 60 minutes à 37°C (ou overnight à 4°C) avec un anticorps monoclonal anti protéine associé à l'actine: anti-taline (dilution 1/20), anti-vinculine (dilution 1/20), anti- α -actinine (dilution 1/20). Après des rinçages au PBS, nous avons incubé les cellules, pendant 60 minutes à 37°C, avec un deuxième anticorps anti IgG de souris couplé à la fluorescéine (dilué 1/500 dans le PBS-lait 1%). Par la suite, nous avons incubé les cellules, pendant 60 minutes à 37°C, avec un anticorps anti-PRL (dilué 1/500 dans le PBS-lait 1%), suivi d'une incubation de 60 minutes à 37°C d'un deuxième anticorps anti IgG de lapin couplé au TRITC (dilué 1/200 dans le PBS-1% lait).

Fractionnement sous-cellulaire

Comme la forme cellulaire dépend en partie de l'organisation du cytosquelette d'actine, nous avons par conséquent étudié les protéines associées au cytosquelette d'actine qui pourraient être affectées par le traitement de substances stimulatrices ou inhibitrices de la sécrétion de prolactine, et de cette façon, influencer la forme des cellules lactotropes. Pour étudier l'expression de ces protéines, nous avons initialement analysé la présence de ces protéines par Western blot dans l'homogénat total des cellules lactotropes. Puis, pour étudier des translocations potentielles de ces protéines du cytosol vers la membrane ou le cytosquelette, ou vice versa, nous avons séparé et étudié la *fraction membranaire*, la *fraction cytosolique* et la *fraction cytosquelettique* des cellules lactotropes.

1) Obtention de la fraction membranaire

Nous avons traité les cultures de cellules lactotropes avec divers substances pour une période déterminée selon le protocole. Après les traitements, nous avons rincé les cellules avec du PBS froid. Il est à noter, que lorsque nous avons traité les cellules avec une substance déterminée, la solution de rinçage contenait également la dite substance, à la même concentration que lors des traitements. Après les rinçages, nous avons recueilli les cellules par grattage dans le **tampon A** (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1µg/mL d'aprotinine et de leupeptine) (Muller et al., 1994; Salas et al., 1997). Nous avons lysé les cellules en les homogénéisant à l'aide d'un potter et nous avons centrifugé les

homogénats à 600 rpm (Beckman, CS-6R Centrifuge, rotor GH 3.8) pendant 4 minutes. Le culot (C1) correspond aux cellules entières et aux noyaux. Nous avons récupéré le surnageant (S1) et nous l'avons centrifugé à 15000 g (Beckman, Microfuge ETM) pendant 25 minutes à 4⁰C. Le culot (C2) correspond à la fraction membranaire dans lequel se retrouve surtout de gros fragments de la membrane plasmique, des lysosomes et des mitochondries. Le surnageant (S2) correspond à la fraction cytosolique. La fraction membranaire est lavée avec le **tampon A** et resuspendu dans le tampon d'échantillon (8 M d'urée, 3% SDS, 5% β-mercaptoéthanol, 70 mM Tris-HCl, 0.005% de bleu de bromophénol; pH 6.7). Les protéines du surnageant (S2) sont précipitées en incubant le surnageant avec 10% d'acide trichloroacétique (TCA) froid durant 30 minutes, ensuite le culot est lavé à l'acétone froide: 3 lavages et centrifugation à 15000 g pendant 10 minutes. Les protéines sont resuspendues dans un volume de tampon d'échantillon.

2) Extraction de la fraction du cytosquelette

Après les traitements, nous avons recueilli les cellules par grattage dans le **tampon B** (1 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 600 mM KCl, 1 mM PMSF) et l'ensemble des produits ont été dilué dans le PBS (Côté et al., 1997; Brown et al., 1976). Puis, nous avons centrifugé les homogénats à 15000 g (Beckman, Microfuge ETM) pendant 20 minutes à 4⁰C. Le culot correspond à la fraction du cytosquelette, il est lavé avec le **tampon B** sans Triton X-100 et resuspendu dans un volume du tampon d'échantillon. Les protéines du surnageant sont précipitées avec du méthanol

froid: une incubation overnight à -20°C suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 15000 g à 4°C , et resuspendues dans le tampon d'échantillon.

Dosage de protéines des échantillons

Pour quantifier la concentration de protéines dans les échantillons, nous avons utilisé deux méthodes: 1) le dotMETRIC en utilisant le protocole et le kit développé par la compagnie Chemicon, lorsque la concentration de protéines était très basse ou lorsque le volume d'échantillon était très petit; et 2) la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant le kit vendu par Bio-Rad.

Électrophorèse sur gels dénaturants SDS-polyacrylamide et western blot

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gels de polyacrylamide-SDS. La concentration d'acrylamide dans nos gels est de 10%. Les échantillons resuspendus dans un volume de tampon d'échantillon (8 M d'urée, 3% SDS, 5% β -mercaptoéthanol, 70 mM Tris-HCl, 0.005% de bleu de bromophénol; pH 6.7) sont chauffés à 100°C pendant 3 minutes. Par la suite, à l'aide d'une seringue nous avons chargé les puits avec les échantillons. Nous avons soumis les gels à un voltage de 120 volts. Lorsque la migration des protéines est terminée (environ 3 heures), nous avons transféré les protéines présentes sur le gel vers une membrane de nitrocellulose avec des pores de $45\mu\text{m}$. Le transfert des protéines est effectué overnight à un courant de 5 milliampères, à 4°C . Après le transfert, la membrane de nitrocellulose est rincée au PBS pour être ensuite saturée dans le BLOTTO (Johnson et al., 1984) pendant 1

heure à 37°C. Après le blocage, nous avons incubé la membrane de nitrocellulose pendant 2 heures à 37°C avec l'anticorps spécifique dirigé contre la protéine que nous désirons détecter (dilué dans le PBS-5% de lait): anti-PRL produit chez le lapin (dilution 1/5000), anti-GH produit chez le singe (dilution 1/30000), anti-ACTH produit chez le lapin (dilution 1/5000), anti-LH produit chez le cochon d'Inde (dilution 1/20000), anti-TSH produit chez le lapin (dilution 1/500), anti-S-100 produit chez le lapin (dilution 1/3000), anti-tubuline monoclonal (dilution 1/500), anti-taline monoclonal (dilution 1/500), anti-filamine monoclonal (dilution 1/20), anti-vinculine monoclonal (dilution 1/500), anti- α -actinine monoclonal (dilution 1/500), anti-chaîne légère de la myosine monoclonal (IgM; dilution 1/500), anti-actine monoclonal (dilution 1/200), anti-vimentine produit chez le lapin (dilution 1/200). Par la suite, nous avons lavé les membranes de nitrocellulose avec du PBS-Tween 0.05% (4 lavages de 15 minutes à 37 °C). Le deuxième anticorps (dirigé contre les immunoglobulines de l'animal chez lequel le premier anticorps est produit) est couplé à phosphatase alcaline (dilution 1/3000) ou à la peroxydase de raifort (HRP) (dilution 1/1000). Dans le cas de la phosphatase alcaline, le complexe anticorps-antigène est révélé par l'ajout des substrats de la phosphatase: NBT (5-bromo-4-chloro-3-indoylphosphate p-toluidine) et BCIP (p-nitro blue tetrazolium chloride). Dans le cas d'utilisation des deuxièmes anticorps couplés à la peroxydase, nous avons détecté le complexe antigène-anticorps par chimiluminescence (Boehringer). Cette méthode est plus sensible que celle qui utilise la phosphatase alcaline.

Sources des produits chimiques et des anticorps

Nous avons utilisé des rats femelles Sprague-Dawley (Charles River, St. Constance, Québec). Les antibiotiques (la pénicilline, la streptomycine, et la gentamycine), la nystatine, l'inhibiteur de trypsine, la poly-L-lysine, la dopamine, la forskoline, la bromocriptine, le 8-Br AMPc, l'anticorps anti-S100, les anticorps monoclonaux anti-taline, anti-vinculine, anti-filamine, anti-spectrine, anti chaîne légère de la myosine, anti-actine, les deuxièmes anticorps fluorescents anti-IgG de souris couplé au FITC, anti-IgG de lapin couplé au TRITC et anti-IgM de lapin couplé au FITC ont été achetées chez Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO, É-U). Le sérum de cheval et le sérum foetal bovin proviennent de chez GIBCO BRL Products (Burlington, Ontario). Les anticorps monoclonaux anti-taline et anti- α -actine ont été achetés chez Chemicon (Temecula, CA, É-U). L'inhibiteur de PKA, le KT5720; la nifedipine, un bloqueur des canaux Ca^{2+} et la néomycine proviennent de Calbiochem (La Jolla, CA, É-U). L'exoenzyme C3 *Clodistridium botulinum* est de List Biological Labs (Campbell, CA, É-U). Les anticorps anti hormones hypophysaires proviennent du National Institute of Health (NIH). La rhodamine-phalloïdine a été achetée chez Molecular Probes (Eugene, OR, É-U). Le kit de chimiluminescence, les enzymes de digestion (la trypsine, la collagénase D et le BSA), les anticorps anti-IgG de souris et anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase ont été achetés chez Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada). La solution de Percoll a été achetée chez Pharmacia Biotech Inc. (Baie d'Urfé, Québec).

RÉSULTATS

1. CARACTÉRISATION DE L'EFFET DE LA DOPAMINE SUR LA MORPHOLOGIE DES CELLULES HYPOPHYSAIRES (LACTOTROPES ET NON-LACTOTROPES).

A) Effet de la dopamine sur le cytosquelette d'actine et la forme des cellules lactotropes en culture.

Nous avons étudié l'effet de la dopamine, un inhibiteur de la sécrétion et de la synthèse de la prolactine, sur le cytosquelette d'actine et la forme des cellules lactotropes en culture. Pour ce faire, nous avons incubé des cellules hypophysaires dans un milieu de culture qui ne contenait pas de dopamine (A-A') ou qui contenait 100 nM de dopamine (B-B') pendant 24 heures. Après traitement, nous avons préparé les cellules pour la microscopie de fluorescence. Nous avons marqué les cellules avec des anticorps anti-PRL pour identifier les cellules lactotropes et avec la phalloïdine-rhodamine pour marquer les filaments d'actine. Les micrographies A-A' de la figure 2 montrent la même cellule qui affiche un marquage pour la prolactine (A) et pour les filaments d'actine (A'). Cette cellule n'a pas été traitée à la dopamine. On peut distinguer les amas de granules de sécrétion (A, flèche). La forme de la cellule est polygonale et présente des filaments cytoplasmiques d'actine (A, tête de flèche) et le cytosquelette cortical d'actine est discontinu (tête blanche). Les micrographies B-B' sur la même figure montrent une cellule traitée à la dopamine pendant 24 h. La forme de cette cellule est arrondie, les amas de granules de sécrétion contenant la prolactine s'accumulent dans la cellule et l'espace cytoplasmique de la cellule traitée est réduit comparativement à la cellule non traitée à la dopamine. Les filaments d'actine du cytoplasme disparaissent et se retrouvent principalement sous la membrane plasmique

(B', tête de flèche blanche). Le cytosquelette cortical d'actine est continu. Dans tous les cas l'arrondissement des cellules lactotropes était accompagné du désassemblage de fibres cytoplasmiques d'actine. Les changements morphologiques induits par la dopamine ne sont pas affectés par l'incubation des cellules lactotropes sur d'autres matrices extracellulaires, tel le collagène des queues de rat.

B) Étude dose-réponse

Nous avons fait l'étude de l'effet de concentrations croissantes de dopamine sur la forme des cellules hypophysaires. Nous avons incubé des cellules hypophysaires en culture avec des concentrations croissantes de dopamine (0-5 μM) pendant 48 heures. L'étude a démontré que la dopamine induisait des changements morphologiques à des concentrations aussi minimales que 50-100 nM (figure 3A) ce qui correspond aux concentrations de dopamine présentes dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Une concentration de 10nM n'affectait pas la morphologie des cellules lactotropes (figure 3A). Ainsi, les changements morphologiques induits par la dopamine ne sont pas des effets pharmacologiques. Nos résultats indiquent aussi que l'effet de la dopamine était toujours maximale (~80%): les cellules étaient affectées ou elles ne l'étaient pas. Cependant, il y a un 20% de cellules lactotropes qui n'était pas sensible à la dopamine (figure 3A) et qui demeuraient allongées malgré l'incubation avec des concentrations de dopamine très élevées.

C) L'effet de la dopamine implique l'activation des récepteurs D2 dopaminergiques.

Par la suite, nous avons incubé les cellules hypophysaires avec un agoniste des récepteurs D2, la bromocriptine. La bromocriptine, à des concentrations similaires à la dopamine, induisait aussi l'apparition du phénotype arrondi dans les cellules lactotropes (figure 3A). Donc, l'effet de la dopamine sur la morphologie des cellules lactotropes implique l'activation des récepteurs D2.

D) La dopamine et la bromocriptine affectent uniquement la morphologie des cellules lactotropes.

L'hypophyse antérieure possède six sortes de cellules. L'étude dose-réponse de l'effet de la dopamine et de la bromocriptine sur la forme des cellules hypophysaires a démontré que la forme des cellules non-lactotropes (cellules immunonégatives pour l'anticorps anti-PRL) n'était pas affectée par les traitements à la dopamine ou à la bromocriptine et cela même pour des concentrations aussi élevées que 5 μM (figure 3B.). Cela signifie que les changements de la forme cellulaire induits par la dopamine et la bromocriptine sont exclusifs aux cellules lactotropes.

E) Étude cinétique de l'effet de la dopamine sur la forme des cellules lactotropes.

Nous avons fait l'étude cinétique de l'effet de la dopamine sur la forme des cellules lactotropes et non-lactotropes qui se retrouvent dans une culture hypophysaire mixte (figure 4A et 4B). Dans un premier temps, nous avons incubé les cellules dans un milieu de culture qui ne contenait pas de dopamine. Nous avons observé que les cellules lactotropes incubées en l'absence de dopamine avaient tendance à s'aplatir dans le temps (figure 4A,®) contrairement aux cellules non-lactotropes qui maintenaient leur phénotype arrondi pour des périodes aussi longues que 96 heures (figure 4B, ®). Lorsque nous avons incubé les cellules avec un milieu de culture qui contenait 100 nM de dopamine, les cellules lactotropes n'avaient plus tendance à s'aplatir; elles demeuraient arrondies (figure 4A,O). On pourrait donc dire que l'effet de la dopamine serait de maintenir un phénotype arrondi dans les cellules lactotropes en culture. L'effet de la dopamine était plutôt lent, la dopamine induisait l'arrondissement des cellules lactotropes seulement après 4 à 8 heures de traitement. Quant aux cellules non-lactotropes (figure4B, O), elles n'ont pas été affectées par le traitement à la dopamine et cela même après des périodes d'incubation aussi longues que 96 heures.

F) La dopamine agit directement sur les lactotropes.

Comme il existe un contrôle paracrine sur la sécrétion de la prolactine (Hagen et al., 1986; Nagy et al., 1988), nous avons voulu déterminer si l'action de la dopamine est

un effet direct sur les cellules lactotropes ou si la dopamine agit d'abord sur d'autres types cellulaires hypophysaires. Pour arriver à ce but, nous avons fait l'étude cinétique de l'effet de la dopamine sur la forme des cellules lactotropes soit à partir d'une culture mixte, soit à **partir d'une population enrichie en cellules lactotropes**. Dans une culture hypophysaire mixte, la dopamine était capable d'induire l'arrondissement des cellules lactotropes (figure 4AO). De la même façon, la dopamine était capable du maintien du phénotype arrondi dans les cellules lactotropes présentes dans une culture enrichie en cellules lactotropes (figure 4CO). Cela suggère que la dopamine a un effet direct sur les cellules lactotropes et cet effet n'implique pas la participation d'autres types cellulaires de l'hypophyse.

Lorsque que nous avons incubé les cultures de cellules lactotropes avec un milieu de culture qui contenait 100 nM de dopamine pendant 48 heures, pour ensuite retirer la dopamine du le milieu pendant 24 ou 48 heures, les cellules lactotropes redevenaient polygonales (figure 4C●, (-DA) + flèche). Ceci suggère que l'effet de la dopamine est réversible et que les cellules nécessitent la présence constante de la dopamine pour garder le phénotype arrondi.

2. ÉTUDE DES VOIES INTRACELLULAIRES IMPLIQUÉES DANS L'ARRONDISSEMENT DES CELLULES LACTOTROPES INDUIT PAR LA DOPAMINE.

Nos résultats indiquent que la dopamine agit au niveau des récepteurs D2 pour induire les changements du cytosquelette d'actine et de la forme cellulaire des lactotropes. Il a été prouvé que la stimulation des récepteurs D2 inhibe l'adénylate cyclase et

diminue les concentrations intracellulaire de Ca^{2+} (Ben-Jonathan, 1985; Swennen et Deneff, 1982). Certaines évidences expérimentales suggèrent aussi l'inactivation de la phospholipase C de lactotrope par la dopamine. Nous avons donc cherché à déterminer si ces messagers intracellulaires sont impliqués dans la réorganisation de cytosquelette d'actine et l'arrondissement des cellules lactotropes induits par la dopamine.

A) l'AMPc

L'inhibition de l'adénylate cyclase entraîne une diminution de la concentration intracellulaire de l'AMPc et donc une réduction de l'activité de la protéine kinase A (PKA). Pour connaître l'implication de cette voie de signalisation intracellulaire dans l'arrondissement des cellules lactotropes induit par la dopamine, nous avons utilisé deux stratégies; 1) nous avons étudié l'effet de substances qui augmentent l'activité de l'adénylate cyclase et indirectement l'activité de la PKA, tel la forskoline, sur le cytosquelette d'actine et la forme des cellules lactotropes et 2) nous avons évalué l'effet de substances qui stimulent directement la PKA, tel le BrAMPc, ou qui inhibent directement l'enzyme tel, le KT5720 sur le cytosquelette d'actine et la forme des cellules lactotropes.

1- La forskoline, un stimulateur de l'adénylate cyclase

La forskoline est une substance qui stimule l'adénylate cyclase (Seamon et al., 1981). Puisque la dopamine possède l'effet contraire, c'est-à-dire, elle inhibe cette enzyme,

nous avons voulu déterminer si la forskoline avait aussi un effet contraire à la dopamine sur la forme cellulaire des cellules lactotropes. Tout d'abord nous avons réalisé une étude dose-réponse de l'effet de la forskoline sur les changements de la forme cellulaire. Cette étude a démontré que la forskoline, à des concentrations de 1 à 10 μM , induisait l'apparition du phénotype aplati chez les cellules lactotropes et les cellules non-lactotropes (figure 5). Par la suite, nous avons réalisé une étude cinétique de l'effet de la forskoline sur les changements de la forme cellulaire des lactotropes dans une culture hypophysaire mixte. Nous avons observé que les cellules lactotropes incubées dans un milieu de culture qui contenait 1 μM de forskoline avait tendance à perdre leur phénotype arrondi plus rapidement et avec une proportion plus élevée que les lactotropes incubées dans un milieu de culture qui ne contenait pas de forskoline (figure 6).

Comme la dopamine et la forskoline induisent des effets opposés sur la concentration intracellulaire d'AMPC et sur la forme des cellules lactotropes, nous avons étudié l'effet de la forskoline sur l'arrondissement des cellules lactotropes induit par la dopamine. Lorsque les cellules en culture ont été traitées simultanément avec la forskoline et la dopamine (figure 7A: DA+F) ou avec la forskoline et la bromocriptine (figure 7B: BrC+F), elles n'affichaient plus un phénotype arrondi mais elles devenaient polygonales. Ceci nous indique que la forskoline est capable d'abolir l'effet de la dopamine / bromocriptine même en présence de ces substances. La présence des autres types cellulaires hypophysaires n'était pas nécessaire puisque la

forskoline affectait quand même la forme des cellules lactotropes en l'absence d'autres cellules hypophysaires (figure 7C).

De plus, l'addition de forskoline en la présence de dopamine ou de bromocriptine à des cellules traitées au préalable avec la dopamine ou la bromocriptine pendant 24 heures, donc déjà arrondies, inhibait aussi l'apparition du phénotype arrondi (figure 8A et B). Cela suggère que la forskoline est capable de renverser l'effet de la dopamine et cela même lorsque les cellules sont déjà arrondies.

2- Le 8 BrAMP, un stimulateur de la PKA.

Nos résultats démontrent jusqu'à maintenant que la forskoline, un stimulateur de l'adénylate cyclase, affecte la forme des cellules lactotropes d'une façon opposée à celle de la dopamine. Pour confirmer si l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc, qui active PKA, induit des changements de la forme cellulaire opposés à la dopamine nous avons incubé les cellules hypophysaires avec un analogue de l'AMPc, le 8 BrAMPc qui est perméable à la membrane plasmique. Comme on peut le constater dans la figure 9 (▲), le 8 BrAMPc (2.5 mM) augmente le pourcentage des cellules lactotropes aplaties. La cinétique d'apparition des cellules aplaties est semblable à celle de la forskoline (figure 9).

3- L'inhibiteur de la PKA, le KT5720

Par la suite, nous avons vérifié si l'inhibition de l'enzyme PKA fait partie du mécanisme intracellulaire, dépendant de l'AMPc, activé par la dopamine et impliqué dans l'arrondissement des cellules lactotropes. Pour inhiber l'activité de la PKA, nous avons utilisé la drogue KT5720. Cette substance inhibe les protéines kinases qui dépendent de l'AMPc (Gadbois et al., 1992; Cabell et Audesirk, 1993). Comme nous pouvons le constater dans la figure 10A, l'incubation des cellules avec des concentrations plus élevées que 10nM de KT5720 pendant 48 heures, augmentait le pourcentage de cellules rondes. Ce résultat est un effet maximal puisque des concentrations plus élevées de KT5720 n'impliquaient pas une augmentation du pourcentage de cellules rondes au dessus 50% (figure 10A).

La dopamine était plus puissante que le KT5720 pour inhiber l'apparition des cellules aplaties (figure 10B). Ce qui suggère que certaines cellules ne sont pas sensible à la KT5720 ou bien que dans une certaine population de cellules lactotropes l'inhibition de la PKA ne conduisait pas à l'acquisition d'un phénotype arrondi. L'incubation simultanée des cellules avec la dopamine et le KT5720 conduisait au même pourcentage de cellules rondes que l'incubation des cellules avec la dopamine uniquement (figure 10B, DA et KT5720+DA). Il y a donc un pourcentage de cellules lactotropes où l'induction de la forme arrondie par la dopamine n'impliquerait pas l'inactivation de la PKA. Le KT5720 bloquait l'apparition du phénotype aplati induite par la forskoline (figure 10B, KT5720+F comparer avec KT5720 et F). Ce qui nous indique la spécificité de l'effet de KT5720 sur la PKA.

B) Le calcium

Le Ca^{2+} participe aux mécanismes intracellulaires impliqués dans l'inhibition de la sécrétion de la prolactine par la dopamine (Lamberts et MacLeod, 1990; Martinez et Weiner, 1992). Nous avons donc étudié la possibilité que le Ca^{2+} soit impliqué dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'arrondissement des cellules lactotropes induits par la dopamine. Nous avons traité les cellules avec la nifedipine (500 nM) une substance qui bloque les canaux de Ca^{2+} de type-L qui sont sensibles à la dihydropyridine. De cette façon, l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire vers l'intérieur de la cellule est inhibée (Lamberts et MacLeod, 1990). L'incubation des cultures enrichies en cellules lactotropes pendant 24 heures avec un milieu de culture contenant de la nifedipine (500 nM) prévenait l'apparition du phénotype aplati dans les cellules lactotropes (figure 11, Nif). La nifedipine était aussi puissante que la dopamine pour induire le maintien de la forme arrondie des cellules lactotropes (figure 11). L'incubation simultanée des cellules avec la dopamine et la nifedipine conduisait au même pourcentage de cellules rondes que l'incubation des cellules avec chaque substance individuellement (figure 11, Nif+DA). La nifedipine bloquait l'apparition du phénotype aplati induite par la forskoline et la forskoline inhibait l'apparition du phénotype arrondi induite par la nifedipine (figure 11, Nif+F comparer avec Nif et F). Dans cette situation, l'action des deux substances était annulée et les cellules lactotropes présentaient un pourcentage de cellules lactotropes ayant le phénotype aplati similaire à celui du contrôle.

C) La voie de l'inositol 1,4,5-triphosphate / protéine kinase C (PKC)

Dans les cellules lactotropes, la stimulation du récepteur D2 implique principalement deux voies de signalisation intracellulaire: l'AMPc / protéine kinase A (PKA) et le Ca^{2+} . Cependant, certains résultats expérimentaux suggèrent la participation de la voie PIP_2 / PKC dans l'inhibition de la sécrétion de la prolactine induite par la dopamine (Lamberts et MacLeod, 1990; Judd et al., 1987). L'hydrolyse du PIP_2 (phosphatidylinositol 4,5-diphosphate) membranaire implique l'activation de la phospholipase C (PLC) par une protéine G hétérotrimérique. La PLC hydrolyse le PIP_2 en inositol triphosphate (IP_3) et 1,2-diacylglycérol (DG). L' IP_3 se fixe alors à un canal à calcium de la membrane du réticulum endoplasmique, canal qui s'ouvre à la ruée d'ions Ca^{2+} dans le cytosol. Le 1,2-diacylglycérol (DG) active la PKC et l'activation de PKC stimule la sécrétion de la prolactine (Kaibuchi et al., 1983; Kikkawa et al., 1982). Pour connaître l'implication de cette voie de signalisation intracellulaire dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'arrondissement des cellules lactotropes induits par la dopamine, nous avons traité les cellules avec de la néomycine (1mM), une substance inhibitrice de la phospholipase C. Nous avons incubé des cultures enrichies en cellules lactotropes pendant 24 heures avec du milieu de culture contenant de la néomycine (1mM). Après le traitement, nous avons analysé la forme (arrondie ou aplatie) des cellules lactotropes au microscope de fluorescence. La néomycine induisait le maintien de la forme arrondie des cellules lactotropes mais elle était moins puissante que la dopamine (figure 12). Cela suggère que l'inhibition de la PLC induirait le phénotype arrondi seulement dans certaines cellules lactotropes.

L'incubation simultanée des cellules avec la dopamine et la néomycine conduit au même pourcentage de cellules aplaties que l'incubation des cellules avec la dopamine seulement (figure 12, DA et Néo+DA). Il y a donc un pourcentage de cellules dont la dopamine n'utiliserait pas l'inhibition de la PLC pour induire le phénotype arrondi. La néomycine bloquait l'apparition du phénotype aplati induite par la forskoline et la forskoline inhibait l'apparition du phénotype arrondi induite par la néomycine (figure 12 Néo+F comparer avec Néo et F).

D) Implication d'autres voies de signalisation intracellulaires dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et le maintien du phénotype arrondi des cellules lactotropes induits par la dopamine.

1-Participation de la petite GTPase rho

Plusieurs études ont démontré que l'activation de la petite GTPase rho régularise 1) le cytosquelette d'actine (Marchesky et Hall, 1996); 2) la motilité cellulaire (Ridley et al., 1995); 3) la polarité cellulaire (Strutt et al., 1997); et 4) l'adhésion cellule-cellule et cellule-substrat (Laudanna et al., 1996). Puisque l'arrondissement des cellules lactotropes induit par la dopamine implique la réorganisation du cytosquelette d'actine, nous avons évalué la possibilité que des mécanismes dépendants de rho y participent. Nous avons incubé les cellules en culture avec *Clostridium botulinum* C3, une exoenzyme qui inactive les protéines rho en catalysant leur ADP ribosylation (Aktories et al., 1989; Sekine et al., 1989). Nous avons utilisé une concentration de

10 μ g/mL et les cultures cellulaires ont été incubées pendant 48 et 72 heures pour s'assurer de la captation de la C3 par les cellules (Aktories et al., 1989). Suite au traitement, nous avons observé que le traitement à la C3 avait augmenté le pourcentage de lactotrope arrondies par rapport aux cellules contrôles (figure 13, C3). Cette augmentation était inférieure à celle induite par la dopamine, peut être dû au fait que toutes les cellules n'ont pas pu incorporer la C3. L'addition simultanée de dopamine et de C3 induisait une augmentation du pourcentage de cellules rondes semblable à celle causée par la dopamine seulement (figure 13, C3+DA). La forskoline bloquait l'arrondissement des lactotrope induit par C3, mais C3 ne bloquait pas l'induction du phénotype aplatie par la forskoline (figure 13, C3+F comparer avec C3 et F). Cela suggère que l'étape sensible à rho se retrouve en amont de l'étape sensible à l'AMPc.

2- Participation des tyrosines kinases dans l'arrondissement des lactotrope induit par la dopamine.

La forme cellulaire dépend en partie de l'organisation du cytosquelette d'actine. Le cytosquelette d'actine se prolonge jusqu'aux contacts focaux endroits, d'attachement de la membrane plasmique au substrat. Ces contacts focaux contiennent un complexe de plusieurs protéines formé de tyrosines kinases, de kinases associées aux contacts focaux (FAK) et de protéines d'ancrage des filaments d'actine (vinculine, taline, paxilline et α -actinine). Toutes ces protéines sont liées directement ou indirectement aux intégrines du côté cytoplasmique des membranes. Nous avons donc cherché à

déterminer si l'inactivation des tyrosines kinases était impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'arrondissement des cellules lactotropes induits par la dopamine. Pour ce faire, nous avons incubé les cellules lactotropes en culture en présence de la génistéine, une substance qui inhibe l'activité des tyrosines kinases (Akiyama et Ogawara, 1991). Nous avons observé que la génistéine induisait le maintien de la forme arrondie dans les cellules lactotropes. L'augmentation du pourcentage de cellules lactotropes arrondies était évidente 2 à 4 heures après le traitement à la génistéine (figure 14A). Puis nous avons incubé les cultures avec 30 μ M de génistéine pendant 24 heures et comparé ses effets avec ceux de la dopamine et de la forskoline. La génistéine était moins puissante que la dopamine pour inhiber l'apparition des cellules aplaties (figure 14B). Cela suggère que l'inhibition de l'activité des tyrosines kinases pourrait être impliqué dans l'induction de la forme arrondie dans un pourcentage de cellules lactotropes. L'incubation simultanée des cellules avec la dopamine et la génistéine induisait le maintien de la forme arrondie dans le même pourcentage que la dopamine seule (figure 14B, DA et Gé+DA). Il y a donc un pourcentage de cellules dont la dopamine n'inhiberait pas la tyrosines kinase pour induire le phénotype arrondi. Contrairement à la dopamine, la génistéine bloquait l'apparition du phénotype aplati induite par la forskoline et la forskoline inhibait l'apparition du phénotype arrondi induite par la génistéine (figure 14B, Gé+F comparer avec Gé et F).

3. ÉTUDE DE L'EFFET DE LA DOPAMINE SUR L'EXPRESSION ET LA LOCALISATION DE QUATRE PROTÉINES D'ANCRAGE DES FILAMENTS D'ACTINE: LA TALINE, LA VINCULINE, L' α -ACTININE ET LA MYOSINE II.

Comme la forme cellulaire dépend en partie de l'organisation du cytosquelette d'actine, nous avons par conséquent étudié les protéines du cytosquelette qui pourraient être affectées par des substances qui influencent la forme cellulaire des lactotropes tel la dopamine. On sait, en effet, que la dopamine induit le réassemblage des filaments corticaux d'actine des cellules lactotropes (Carbajal et Vitale, 1997). Nous avons démontré ici que la dopamine induit la dépolymérisation des filaments cytoplasmiques d'actine dans ces mêmes cellules (figure 2 B-B'). Nous avons donc étudié l'effet de la dopamine sur l'expression et la localisation des protéines d'ancrage des filaments d'actine. Les cellules lactotropes en culture expriment les quatre protéines d'ancrage suivantes: la taline, la vinculine, l' α -actinine et la myosine II (mise en évidence par la détection de la chaîne légère) (figure 15). Par contre, les lactotropes en culture n'expriment pas la spectrine (une protéine d'ancrage) (Bennet , 1982) ni la filamine (une protéine d'ancrage et de réticulation des filaments d'actine) (Sato et al. 1987). Cette manque de détection n'est pas la conséquence des anticorps abîmés. La spectrine (260 kDa) est présente en grande quantité dans les érythrocytes (Gundersen et al., 1991). Par immunoblotting, nous avons détecté la présence cette protéine dans les érythrocytes de rat afin de tester l'efficacité de notre anticorps anti-spectrine. Quant à la filamine, les fibroblastes présents dans les cultures étaient positifs pour cette protéine mais les cellules hypophysaires n'étaient pas marquées.

Tout d'abord nous avons étudié l'effet de la dopamine sur l'expression de la taline, la vinculine, l' α -actinine et la myosine (la chaîne légère). Par la suite, nous avons étudié les translocations potentielles de ces protéines du cytosol vers la membrane ou le cytosquelette, ou *vice versa*. Nous avons incubé des cultures enrichies en lactotopes avec 100 et 500nM de dopamine pendant 48 heures; après les traitements, nous avons séparé la fraction membranaire, cytosquelettique et cytosolique des cellules lactotopes pour étudier l'expression de ces protéines.

1) la taline (PM 230 kDa): le traitement à la dopamine pendant 24 heures s'accompagnait d'une augmentation de l'expression de la taline. Cette taline était toujours associée à la fraction membranaire (figure 15A). L'anticorps monoclonal que nous avons utilisé pour détecter la taline reconnaît deux bandes: une bande supérieure de 230 kDa correspondant à la protéine complète et une bande inférieure de 195 kDa correspondant à un fragment de la taline clivée par une enzyme, la calpaine dont l'activité est régulée par le Ca^{2+} . Nos études indiquent que le traitement à la dopamine inhibe le clivage de la taline. Cet effet serait dû à l'inhibition de l'entrée de calcium par la dopamine.

Par contre, nos résultats expérimentaux nous montrent que la taline ne se trouvait pas associée à la fraction du cytosquelette des cellules lactotopes et que le traitement à la dopamine n'affectait pas cet manque d'interaction (figure 15B). Nous avons confirmé ces résultats par microscopie de fluorescence.

2) **la vinculine** (PM 120 kDa): le traitement à la dopamine n'affecte pas l'expression de la protéine qui d'ailleurs reste toujours associée à la fraction membranaire (figure 15A). Tout comme la taline et l' α -actinine, nous n'avons pas retrouvé de vinculine associée au cytosquelette des lactotropes (figure 15B). La dopamine ne modifie pas la non-association de la vinculine au cytosquelette des lactotropes. Nous avons confirmé ces résultats par microscopie de fluorescence.

3) **l' α -actinine** (PM 100 kDa): le traitement à la dopamine induisait une augmentation de l'expression de l' α -actinine, celle-ci demeurait associée à la fraction cytosolique (figure 15A). Encore une fois, nous n'avons pas retrouvé d' α -actine associée à la fraction du cytosquelette des cellules lactotropes (figure 15B). Nous avons confirmé ces résultats par microscopie de fluorescence.

4) **myosine II**: nous avons étudié l'effet de la dopamine sur la myosine en déterminant l'association de la chaîne légère de la myosine (PM 20 kDa) aux fractions membranaires, cytosoliques ou cytosquelettiques des cellules lactotropes. Tout comme la taline, l' α -actinine et la vinculine, la chaîne légère de la myosine est associée à la fraction membranaire des cellules lactotropes (figure 15A). Le traitement à la dopamine n'affecte pas l'expression de la chaîne légère de la myosine ni son association à la membrane. À différence des autres protéines étudiées, la chaîne légère de la myosine est en partie associée à la fraction du cytosquelette. Le traitement à la dopamine pendant 24 heures diminuait l'association de la myosine à la fraction

soluble (figure 15B). Nous avons confirmé ces résultats par microscopie de fluorescence.

figure 2: Effet de la dopamine sur le cytosquelette d'actine et la forme des cellules lactotropes en culture

Nous avons incubé des cultures enrichies en cellules lactotropes avec du milieu d'incubation qui ne contenait pas de dopamine (A-A') ou qui contenait 100nM de dopamine (B-B'). Après traitement, nous avons préparé les cellules pour la microscopie de fluorescence et nous les avons marquées avec des anticorps anti-PRL pour identifier les cellules lactotropes et avec la phalloïdine-rhodamine pour marquer les filaments d'actine. Les micrographies A-A' montrent la même cellule qui affiche un marquage pour la prolactine (A) et pour les filaments d'actine (A'). Cette cellule n'a pas été traitée à la dopamine, nous pouvons distinguer des amas de granules de sécrétion (A, flèche). La forme de la cellule est polygonale et présente des filaments cytoplasmique d'actine (A', tête de flèche). Le cytosquelette cortical est discontinu (tête de flèche blanche). Les micrographies B-B' montrent une cellule traitée à la dopamine pendant 24h. Sa forme est arrondie, les granules de sécrétion contenant la prolactine sont difficilement reconnaissables (B) et les filaments d'actine se retrouvent principalement sous la membrane plasmique (B', tête de flèche). Bar 10µm.

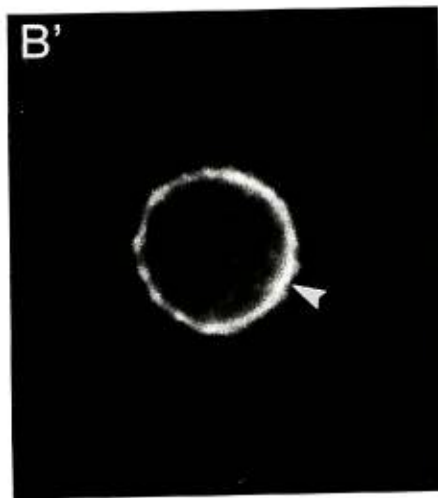
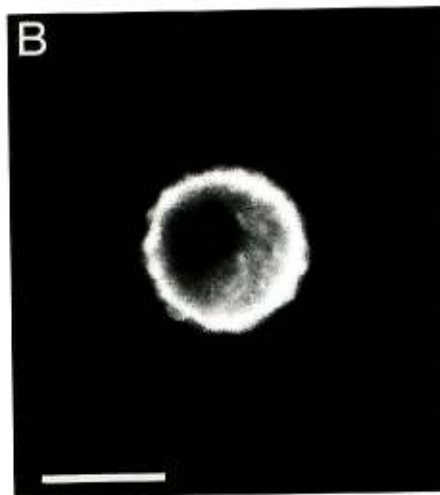
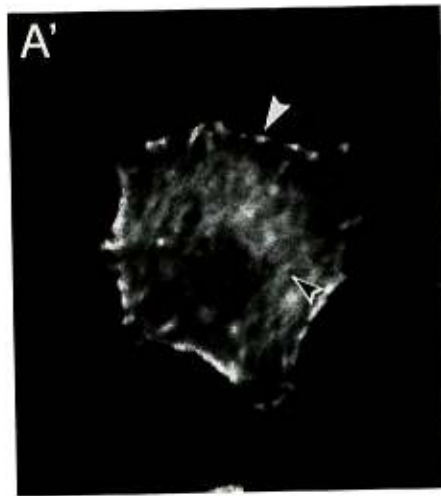
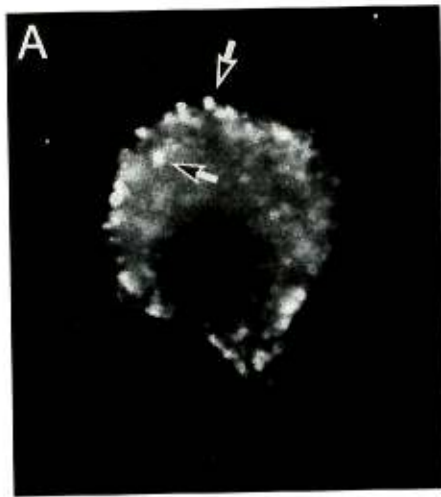


figure 3: Étude dose-réponse de l'effet de la dopamine et de la bromocriptine sur la forme des cellules lactotropes

Nous avons incubé les cellules hypophysaires dans un milieu de culture qui contenait des concentrations croissantes de dopamine (0-5 μ M) ou de bromocriptine (0-5 μ M), un agoniste des récepteurs D2, pendant 48 heures. Après traitement, nous avons marqué les cellules avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine qui marque les filaments d'actine, pour mieux visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les cellules hypophysaires lactotropes (PRL+, A) et non-lactotropes (PRL-, B) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. La dopamine et la bromocriptine préviennent toute deux l'apparition du phénotype aplati et cela à des concentrations aussi minimales que 50nM. Par contre, la forme des cellules non-lactotropes n'est pas affectée par les traitements à la dopamine ou à la bromocriptine et cela même pour des concentrations aussi élevées que 5 μ M. (***, P < 0.001 vs contrôle) * Il est à noter que nous avons défini le t=0 comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.*

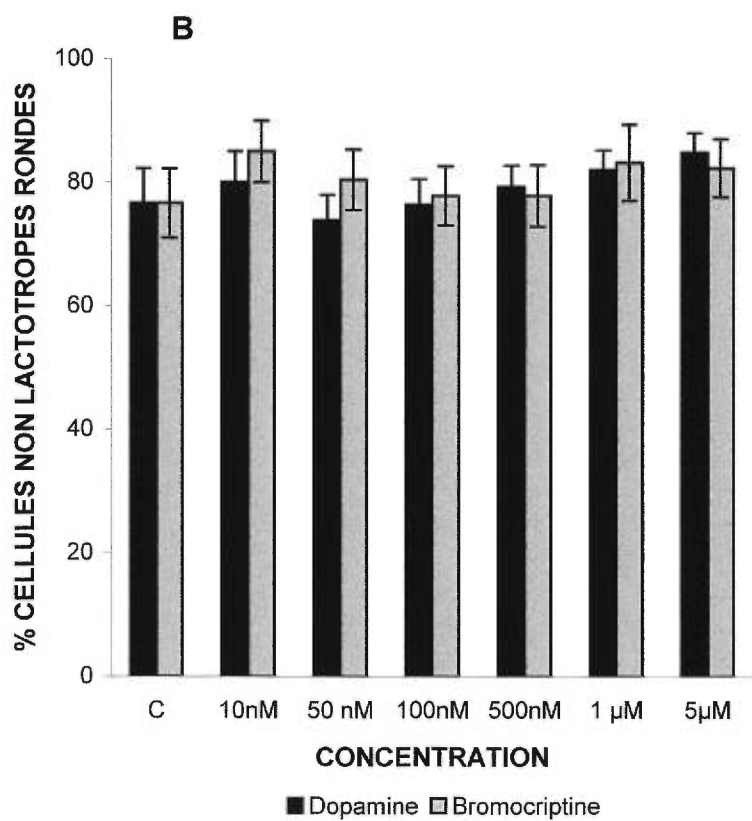
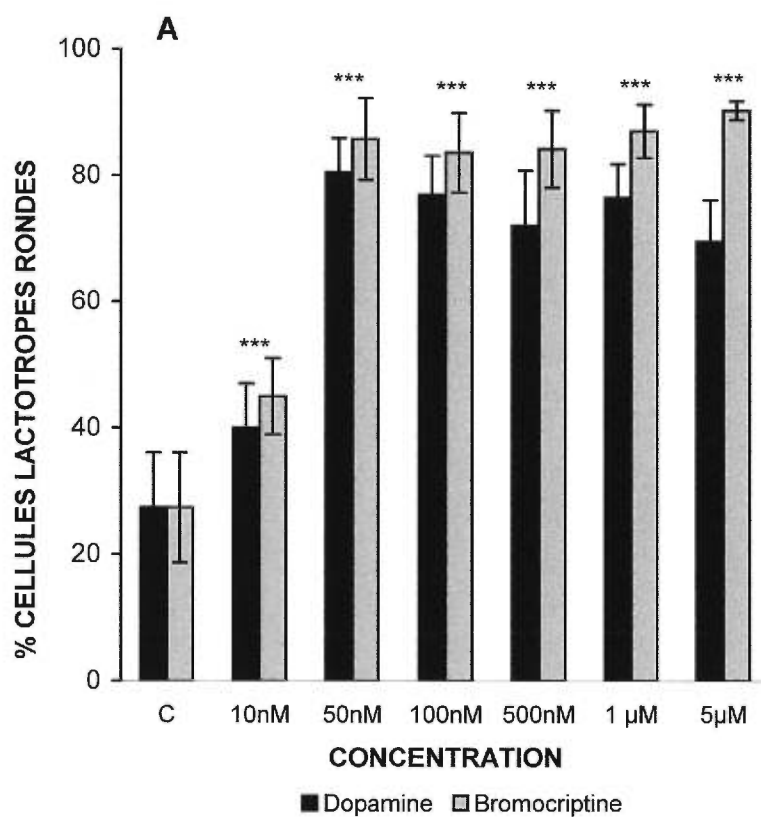


figure 4: Étude cinétique de l'effet de la dopamine sur la forme des cellules lactotropes (A et C) et non-lactotropes (B)

Nous avons incubé des cultures de cellules hypophysaires (A et B) ou des cultures de la fraction enrichie en cellules lactotropes (C) avec un milieu de culture qui ne contenait pas de dopamine (contrôle) ou qui contenait 100 nM de dopamine (DA) durant différentes périodes (0-96 heures). De plus dans le cas de la fraction enrichie en cellule lactotropes (C), après les premières 48 h d'incubation en présence de dopamine, nous avons incubé les cellules en l'absence de dopamine pour 24 et 48 heures. Après les traitements, nous avons marqué les cellules avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine, qui marque les filaments d'actine, pour mieux visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) et non-lactotropes (PRL-) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et calculé le pourcentage de cellules rondes à chaque période. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures de cellules différentes. En l'absence de dopamine, les cellules lactotropes ont tendance à s'aplatir dans le temps contrairement aux cellules non-lactotropes qui maintiennent leur phénotype arrondi pour des temps aussi longues que 96 heures. Lorsque traitées à la dopamine, les lactotropes n'ont plus tendance à s'aplatir, elles s'arrondissent, ainsi l'effet de la dopamine est réversible. * Nous avons défini le t=0 comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.*

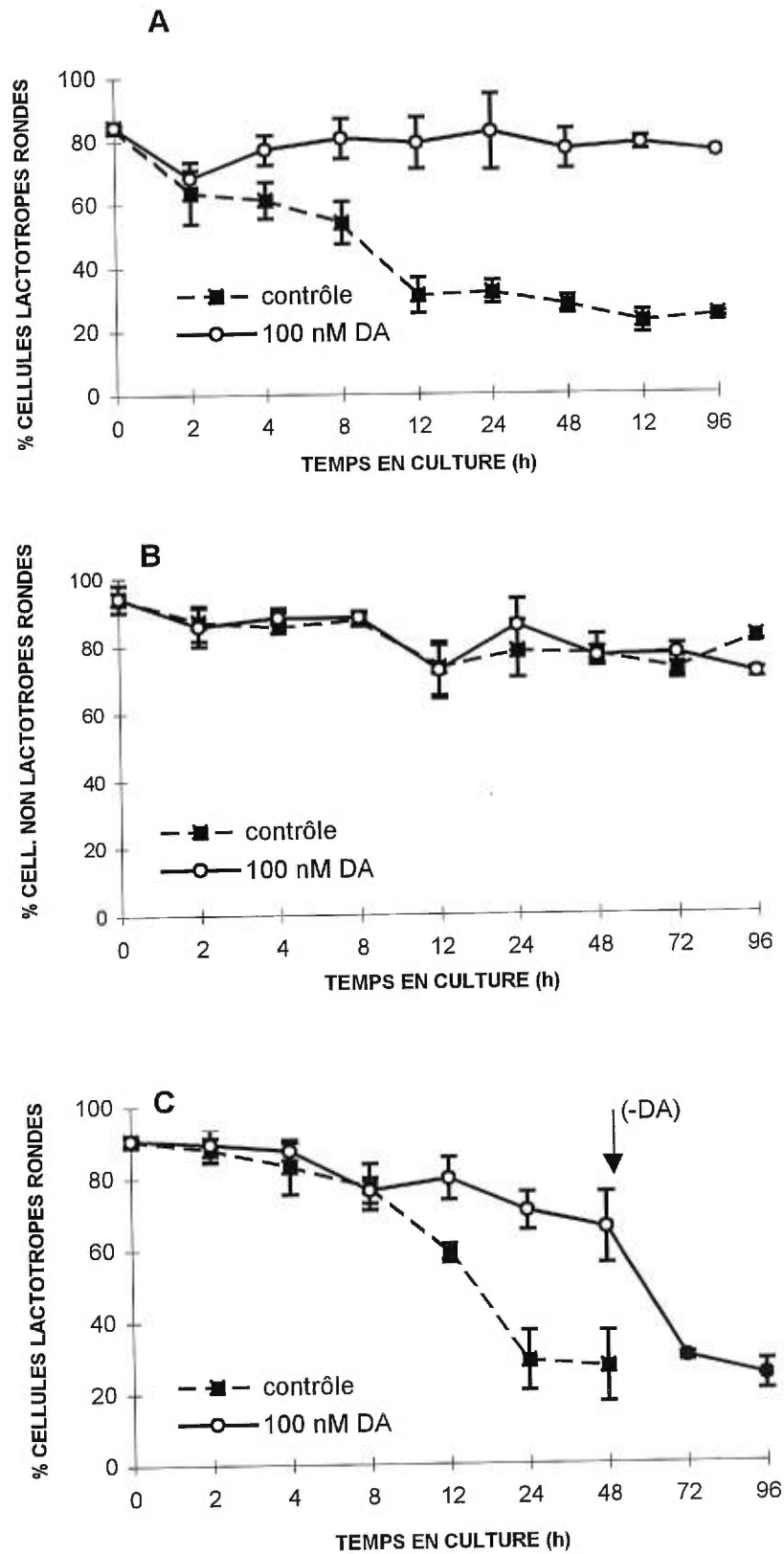


figure 5: **Étude dose-réponse de l'effet de la forskoline sur la forme des cellules lactotropes**

Nous avons incubé les cellules hypophysaires avec un milieu de culture qui contenait des concentrations croissantes de forskoline (1-10 μ M) pendant 48 heures. Après traitement, nous avons a marqué les cellules avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine pour mieux visualiser la forme cellulaire. nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) et non-lactotropes (PRL-) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. La forskoline à des concentrations de 1 à 10 μ M induit l'apparition du phénotype aplati chez les cellules lactotropes et non-lactotropes. (***, P < 0.001 vs contrôle) * Nous avons défini le t=0 comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.*

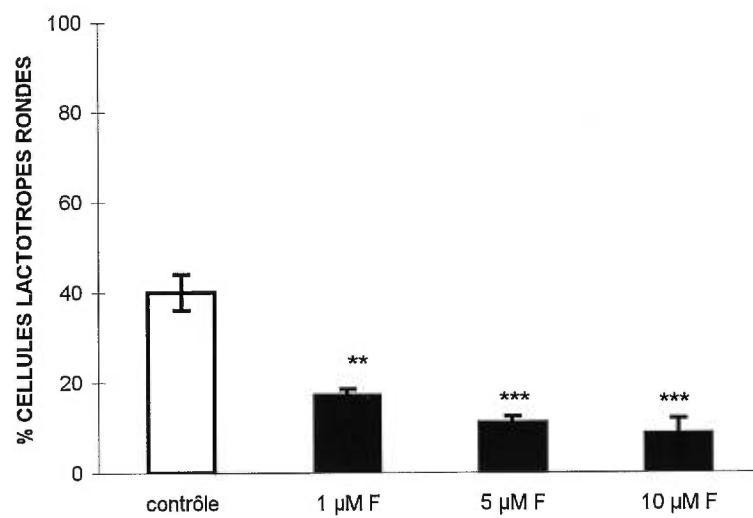
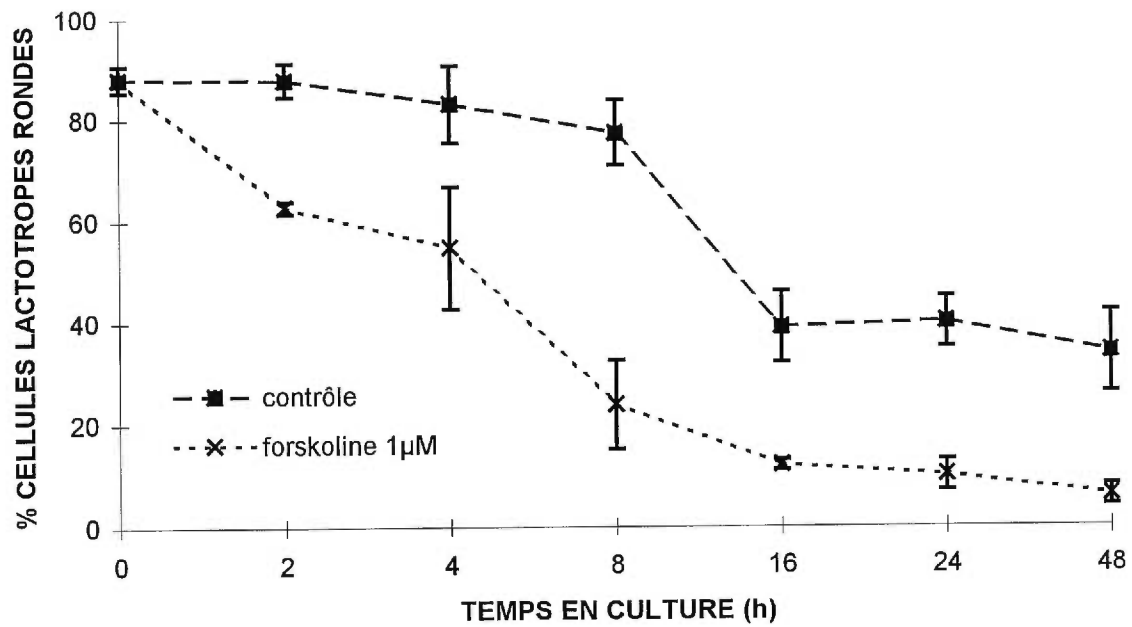


figure 6: Étude cinétique de l'effet de la forskoline sur la morphologie des cellules lactotropes.

Nous avons incubé des cellules hypophysaires avec un milieu de culture qui ne contenait pas de forskoline (contrôle) ou qui contenait 1 μ M de forskoline pendant différents temps (0-48 heures). Après traitement, nous avons marqué les préparations avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine pour mieux visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, on a classifié 100 cellules par lamelle et on a calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. En présence forskoline, les cellules lactotropes ont tendance à perdre leur phénotype arrondi plus rapidement et cela à une proportion plus élevée que les cellules lactotropes incubées dans un milieu contrôle. * Il est à noter que nous avons défini le t=0 comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.*



**figure 7: Étude de l'effet de la forskoline sur les changements morphologiques
des cellules lactotropes induits par la dopamine**

Nous avons incubé des cellules hypophysaires (A et B) pendant 48 heures dans des milieux de culture qui contenaient: 1) 100 et 500 nM de dopamine (DA) ou de bromocriptine (BrC), 2) 1 μ M de forskoline (F) et 3) 100-500 nM DA ou BrC + 1 μ M forskoline (DA+F; BrC+F). En C, nous avons répété la même expérience avec une culture enrichie en cellules lactotropes. Après traitement, on a marqué les préparations avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine pour mieux visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, on a classifié 100 cellules par lamelle et on a calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. La forskoline inhibe l'apparition du phénotype arrondi induit par la DA ou la BrC. (***, $P < 0.001$, F+DA/BrC vs DA/BrC) * Nous avons défini le t=0 comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.*

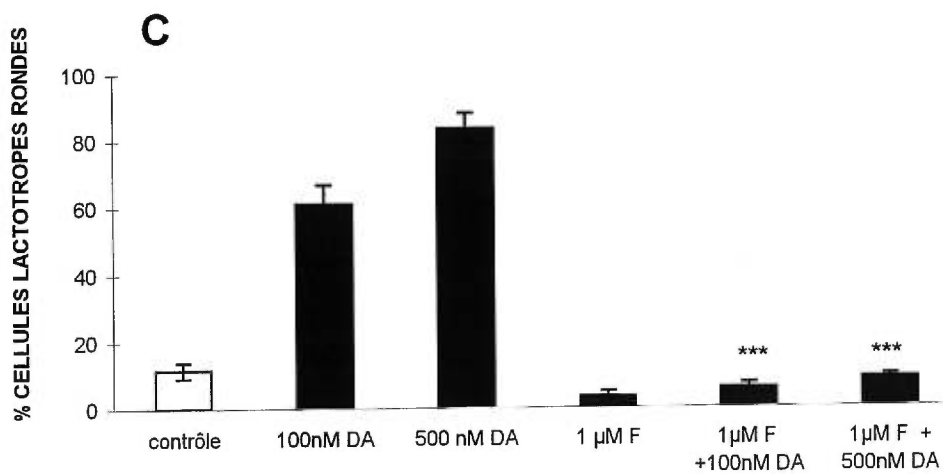
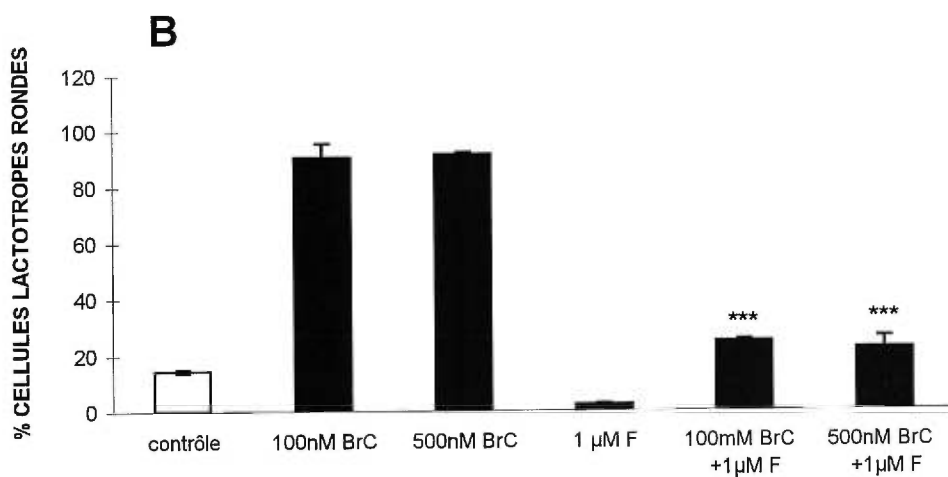
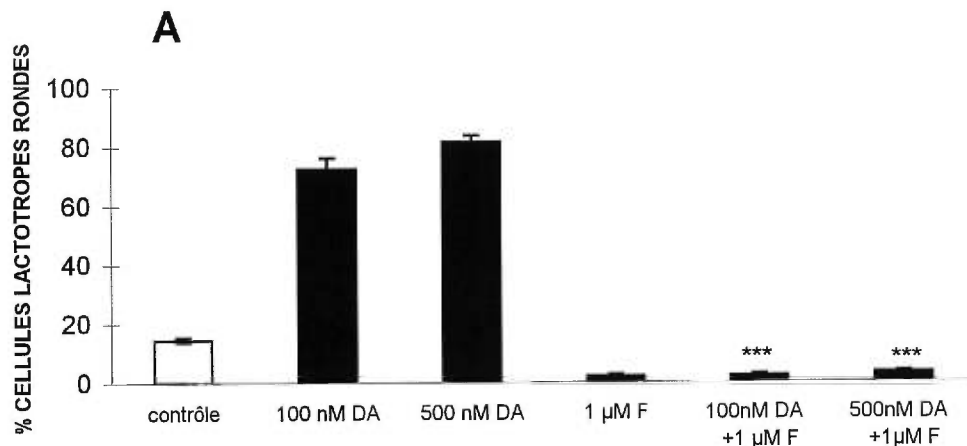


figure 8: Étude de l'effet de la forskoline sur les changements de la forme des cellules lactotropes traitées au préalable avec la dopamine ou la bromocriptine

Nous avons traité des cellules hypophysaires en culture avec la dopamine (DA 500nM) ou la bromocriptine (BrC 500 nM) pendant 24 heures, par la suite nous avons incubé ces mêmes cultures avec un milieu de culture qui contenait de la DA 500nM ou BrC 500nM en présence de 1 μ M de forskoline (F). La durée total du traitement étant donc de 48 heures (24h:24h). Après traitement, nous avons marqué les préparations avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine pour visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et nous avons calculé le pourcentage de lactotropes rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. Nous avons observé que l'addition de F+ DA ou de F+BrC, à des cellules traitées au préalable avec la DA pendant 24 heures, donc déjà arrondies inhibait aussi l'apparition du phénotype arrondi induit par la DA ou la BrC. (***, P < 0.001, F :F+DA ou F :F+BrC vs DA:DA; **, P < 0.01, F :F+BrC ou BrC+F :BrC vs BrC :BrC) * Nous avons défini le t=0 comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.*

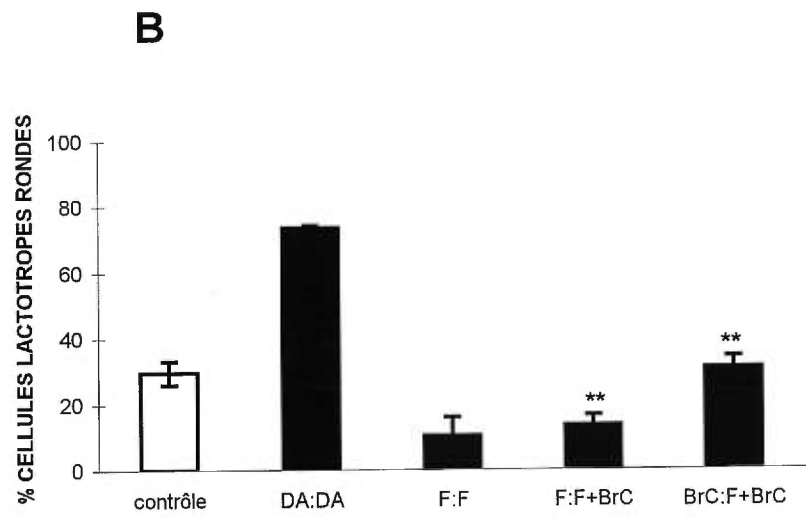
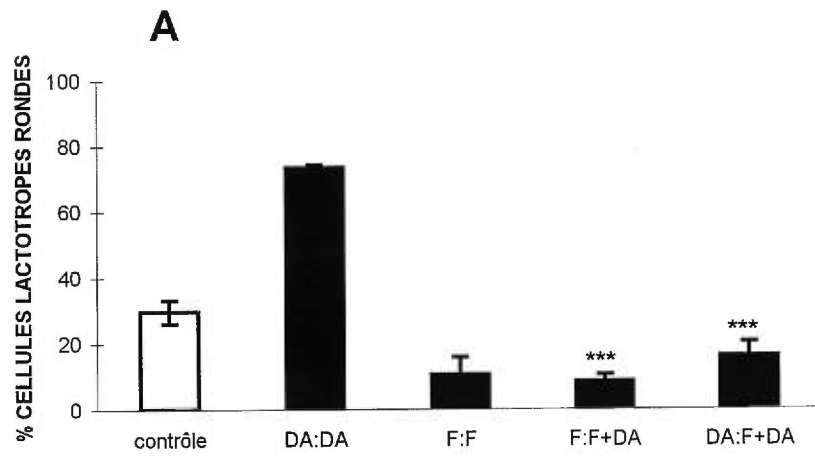


figure 9: **Étude cinétique de l'effet du 8BrAMPc sur la forme des cellules lactotropes.**

Nous avons incubé des cellules hypophysaires avec un milieu de culture sans dopamine (contrôle), ou qui contenait 100nM de DA, 1 μ M de forskoline, ou 2.5mM de 8BrAMPc pendant différents temps (0-48 heures). Après traitement, nous avons marqué les préparations avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine pour mieux visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et nous avons calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. Nous avons observé que le 8BrAMPc, un analogue de l'AMPc, augmente le pourcentage des cellules lactotropes aplati et que sa cinétique est semblable à celle de la forskoline. * Nous avons défini le t=0 comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.*

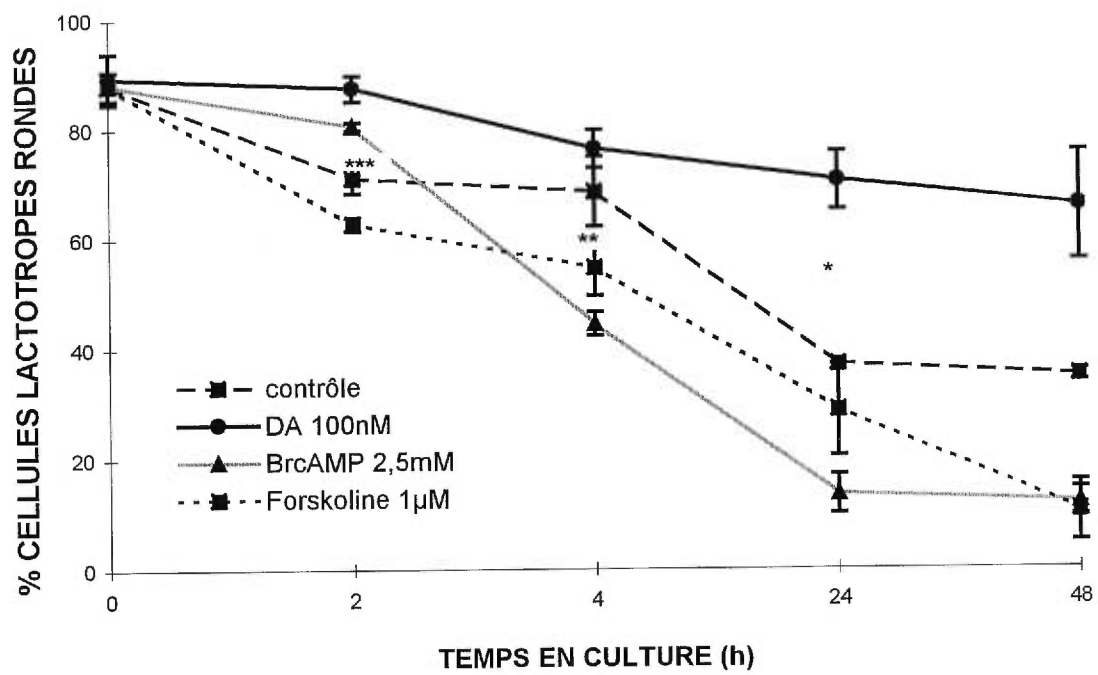


figure 10: (A) **Étude dose-réponse de l'effet de l'inhibiteur de la PKA, le KT5720, sur la forme des cellules lactotropes**

Nous avons incubé des cultures enrichies en cellules lactotropes dans un milieu de culture qui contenait des concentrations croissantes de KT5720 (0-500nM) pendant 24 heures. Après traitement, nous avons marqué les préparations avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine pour mieux visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et on a calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. Le KT5720, un inhibiteur spécifique de la PKA, prévient l'apparition du phénotype aplati et cela même à des concentrations aussi minimales que 50 nM (***, $P < 0.001$, KT5720 50 nM, 100 nM ou 500 nM vs contrôle). * Nous avons défini le $t=0$ comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.*

(B) **Étude de l'effet de l'inhibiteur de la PKA, le KT5720, sur les changements de la forme des cellules lactotropes induits par la dopamine ou la forskoline.**

Nous avons incubé des cultures de cellules enrichies en cellules lactotropes avec un milieu de culture sans DA (contrôle), ou qui contenait 100nM de DA, 1 μ M de F, 100 nM de KT5780 100nM, ou les combinaisons suivantes: KT5720+DA, ou KT5720+F pendant 48 heures. Après traitement, nous avons marqué les

préparations avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine pour mieux visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et on a calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. Le KT5720, un inhibiteur spécifique de la PKA, prévient l'apparition du phénotype aplati. (*, $P < 0.001$ KT5720 vs contrôle ou DA; **, il n'y pas de différence entre KT5720+DA et DA (test de Student), ***, $P < 0.001$, KT5720 vs F) * Nous avons défini le $t=0$ comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.*

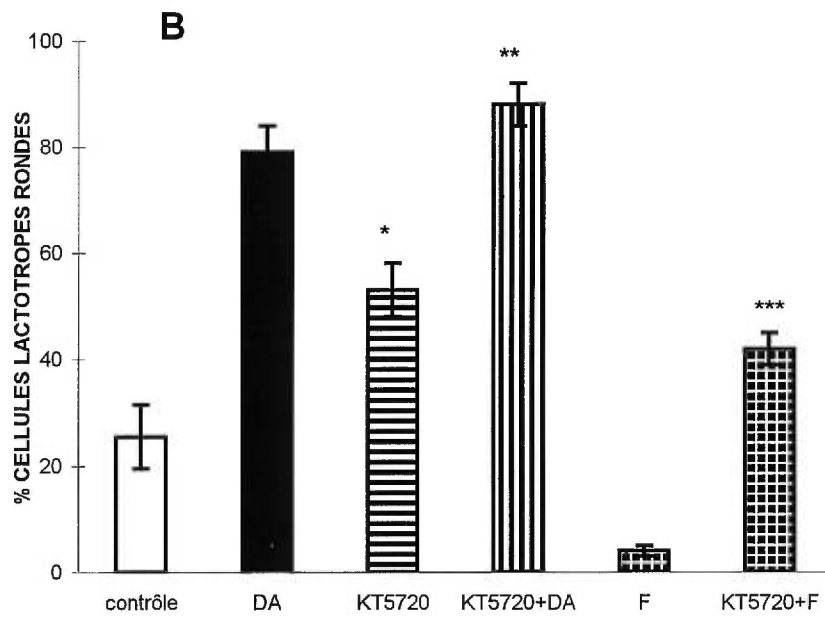
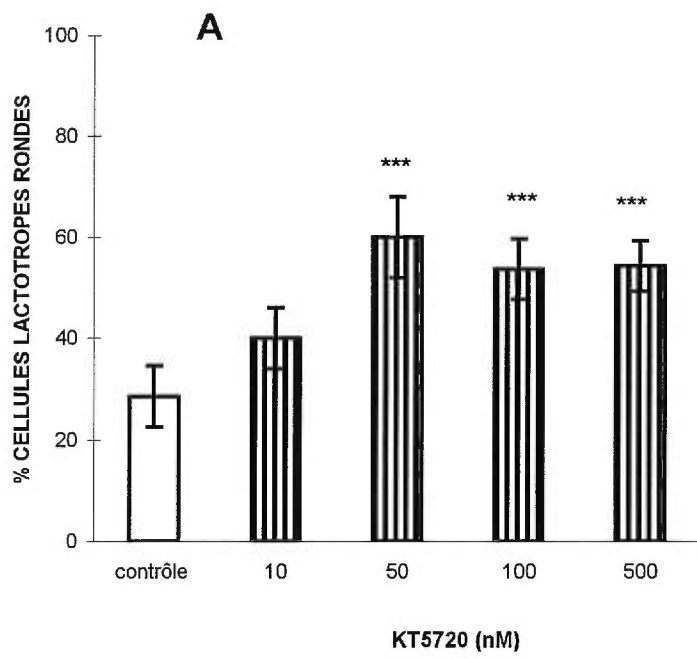


figure 11: Étude de l'effet de l'inhibiteur des canaux calciques de type-L nifedipine, sur les changements de la forme des cellules lactotropes induits par la dopamine ou la forskoline.

Nous avons incubé pendant 48 heures des cultures enrichies en cellules lactotropes avec un milieu de culture qui ne contenait pas de DA (contrôle), ou qui contenait 100nM de DA, 1 μ M de F, 500nM de Nif, ou les combinaisons suivantes: Nif+DA, ou Nif+F. Après traitement, nous avons marqué les préparations avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine pour mieux visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et on a calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. La nifedipine prévenait l'apparition du phénotype aplati. L'addition simultanée de DA et de nifedipine induisait le même effet. La forskoline inhibait l'apparition du phénotype arrondi induite par la nifedipine et la nifedipine bloquait l'apparition du phénotype aplati induite par la forskoline. (*, $P < 0.001$, Nif vs contrôle, il n'y a pas de différence entre DA et Nif (test de Student) ni entre Nif+DA et DA, ***, $P < 0.001$ Nif vs F). * Nous avons défini le t=0 comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.*

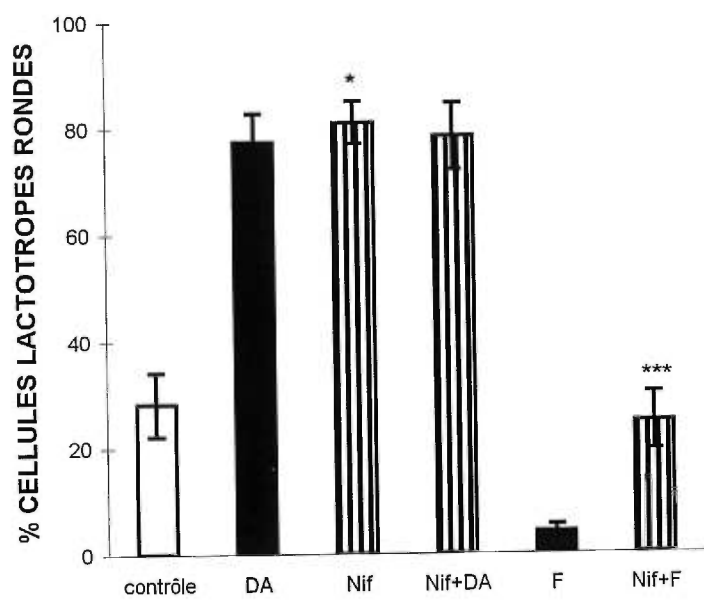


figure 12: Étude de l'effet de l'inhibiteur de la phospholipase C, la néomycine, sur les changements de la forme des cellules lactotropes induits par la dopamine ou la forskoline.

Nous avons incubé pendant 24 heures des cultures enrichies en cellules lactotropes avec un milieu de culture sans DA (contrôle), ou qui contenait de la 100 nM de DA, 1 mM de néomycine (Néo), 1 μ M de F, ou les combinaisons suivantes: Néo+DA, Néo+F. Après traitement, nous avons marqué les préparations avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine pour mieux visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et on a calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. La néomycine prévenait l'apparition du phénotype aplati dans les cellules lactotropes. L'addition simultanée de Néo+DA induisait le même effet. La néomycine bloquait l'apparition du phénotype aplati induite par la forskoline et la forskoline inhibait l'apparition du phénotype arrondi induite par la néomycine (Néo comparer avec Néo+F). (*, $P < 0.001$, Néo vs contrôle et DA; **, $P < 0.001$, Néo+DA vs DA; ***, $P < 0.001$, Néo+F vs F). * Nous avons défini le $t=0$ comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.

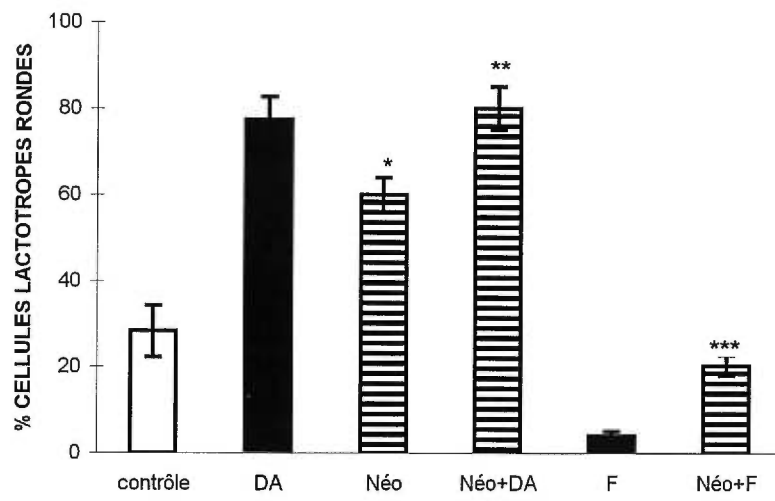


figure 13: **Étude de l'effet de l'inhibiteur de la petite GTPase rho, *Clostridium botulinum* exoenzyme C3, sur les changements de la forme des cellules lactotropes induits par la dopamine ou la forskoline.**

Nous avons incubé pendant 24 heures des cultures enrichies en cellules lactotropes avec un milieu de culture sans dopamine (contrôle), ou qui contenait de la 100 nM de DA, 10 µg/mL de *Clostridium botulinum* C3, 1 µM de F, ou les combinaisons suivantes: C3+DA, C3+F. Après traitement, nous avons marqué les préparations avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine pour mieux visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et on a calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. La C3 prévenait l'apparition du phénotype aplati dans les cellules lactotropes. L'addition simultanée de C3+DA induisait une augmentation du pourcentage de cellules rondes semblable à celle causée par la DA seule. La forskoline bloquait l'arrondissement des lactotrpes induit par la C3, mais C3 ne bloquait pas l'induction du phénotype aplatie par la forskoline (C3 comparer avec C3+F). (*, $P < 0.001$, C3 vs contrôle et DA; **, $P < 0.05$, C3+DA vs DA; ***, $P < 0.05$, C3+F vs F). * Nous avons défini le $t=0$ comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.

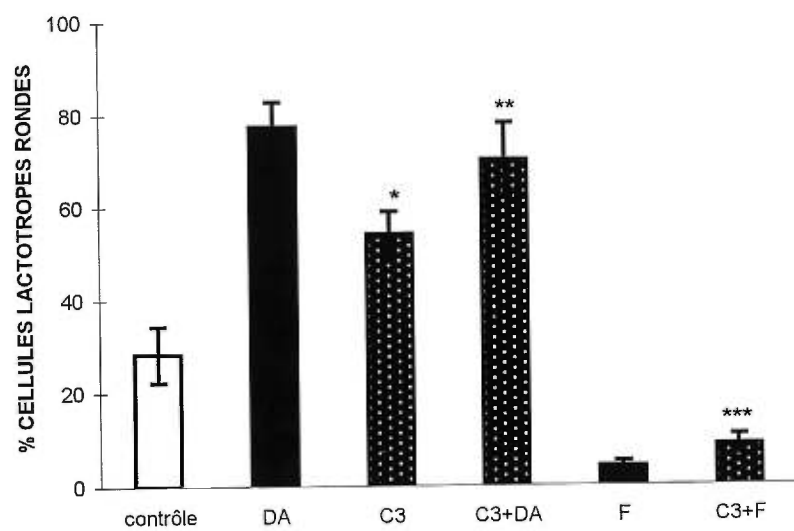


figure 14: (A) Étude cinétique de l'effet de l'inhibiteur des tyrosines kinases, la génistéine, sur la forme des cellules lactotropes

Nous avons incubé des cultures de la fraction enrichie en cellules lactotropes avec un milieu de culture qui ne contenait pas de génistéine (contrôle) ou qui contenait 30 μM de génistéine durant différentes périodes (0-48 heures). Nous avons classifié les cellules lactotropes (PRL+) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et on a calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. En l'absence de génistéine les cellules lactotropes avait tendance à s'aplatir dans le temps. Lorsque traité à la génistéine, les cellules lactotropes n'avaient plus tendance à s'aplatir, elles s'arrondissaient. *Nous avons défini le $t=0$ comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.

(B) Étude de l'effet de l'inhibiteur des tyrosines kinases, la génistéine, sur la forme des cellules lactotropes .

Nous avons incubé pendant 24 heures des cultures enrichies en cellules lactotropes avec un milieu de culture sans dopamine (contrôle), ou qui contenait de la 100 nM de DA, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de génistéine (Gé), 1 μM de F, ou les combinaisons suivantes: Gé+DA, Gé+F. Après traitement, nous avons marqué les préparations avec des anticorps anti-PRL pour identifier les lactotropes et avec de la phalloïdine-rhodamine pour mieux visualiser la forme cellulaire. Nous avons classifié les

cellules lactotropes (PRL+) selon leur forme, ronde ou polygonale. Par cette méthode, nous avons classifié 100 cellules par lamelle et on a calculé le pourcentage de cellules rondes. Chaque valeur correspond à l'analyse de 6-8 lamelles (600-800 cellules) provenant d'au moins trois cultures différentes. La Gé prévenait l'apparition du phénotype aplati dans les cellules lactotropes. L'addition simultanée de C3+DA induisait le même effet. La génistéine bloquait l'apparition du phénotype aplati induite par la forskoloine et la forskoline inhibait l'apparition du phénotype arrondi induite par la génistéine (Gé comparer avec Gé+F). (*, $P < 0.001$, Gé vs contrôle et $P < 0.05$, Gé vs DA, **, Gé+DA pas de différence avec DA, ***, $P < 0.001$, Gé+F vs F). * Nous avons défini le $t=0$ comme étant le temps après la période de 24 heures de préincubation.

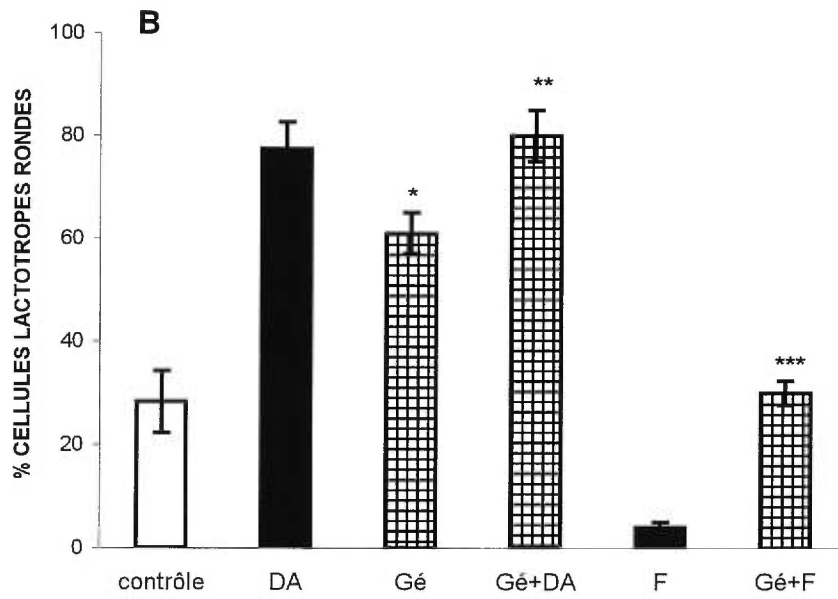
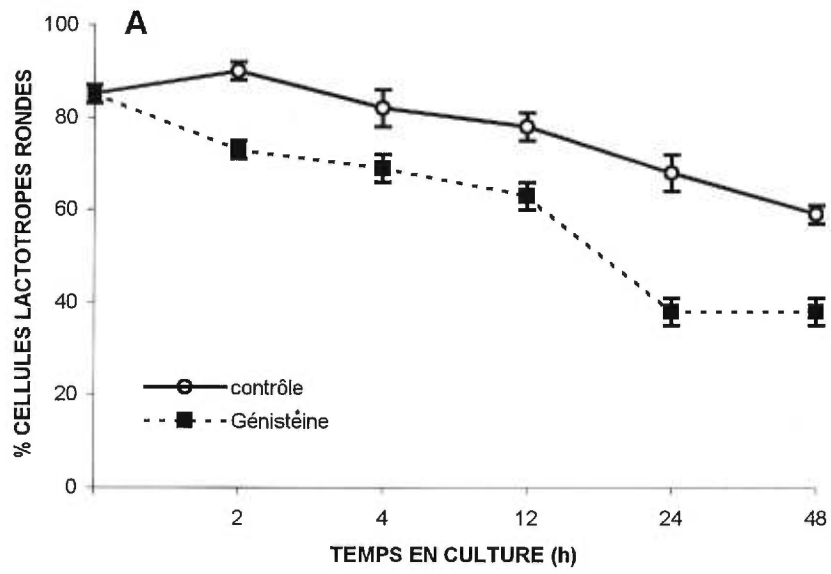
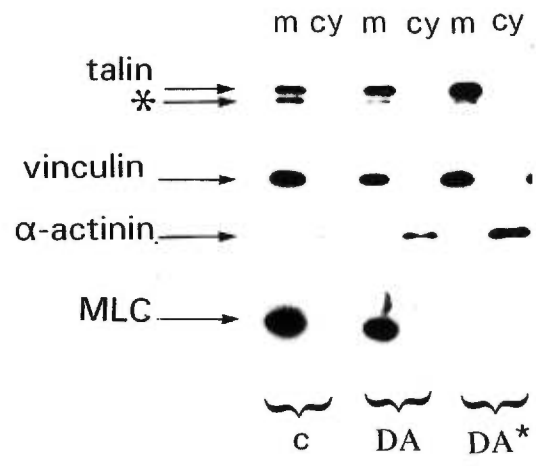


figure 15: Étude de l'effet de la dopamine sur l'association aux membranes (A) et au cytosquelette (B) de quatre protéines d'ancrage des filaments d'actine: la taline, la vinculine, l' α -actinine et la myosine II.

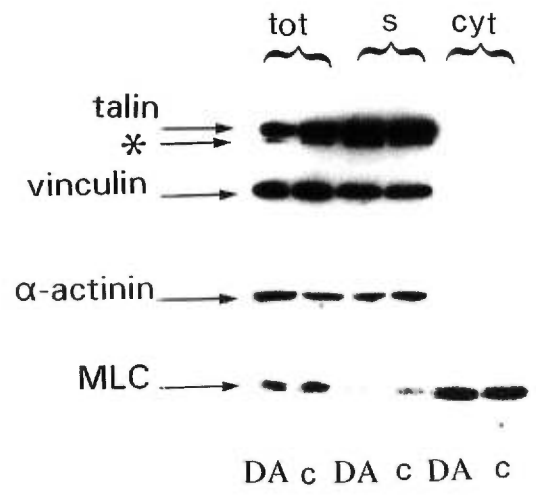
Nous avons incubé des cultures enrichies en cellules lactotropes avec 100 nM ou 500 nM de DA durant 48 heures. Après les traitements, nous avons séparé les fractions membranaires et le cytosolique (A) ou les fractions cytosquelettique et soluble (B). Les protéines de chaque fraction sont resuspendues dans un même volume, et séparées par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide-SDS. Nous avons transféré les protéines sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes sont incubées avec le premier anticorps (dilué dans PBS-lait 5%) pour détecter différentes protéines d'ancrage du cytosquelette d'actine: anticorps monoclonaux: anti-taline (dilution 1/500), anti-vinculine (dilution 1/500), anti- α -actinine (dilution 1/500), anti MLC (dilution 1/500). Le deuxième anticorps anti-souris est couplé à la peroxidase (dilution 1/1000) et le complexe anticorps-antigène est détecté par chimiluminescence. A) Le traitement à la dopamine s'accompagnait d'une augmentation de l'association de la **taline** à la fraction membranaire. Le traitement à la dopamine n'affectait pas de l'expression de la **vinculine** qui restait toujours associée à la fraction membranaire. Le traitement à la dopamine augmentait l'expression de l' **α -actinine** mais celle-ci demeurait associée à la fraction cytosolique. La chaîne légère de la **myosine** était associée à la fraction membranaire. Le traitement à la dopamine n'affectait pas l'expression de la chaîne légère de la myosine ni son association à la membrane. (B) La **taline** ne se trouvait

pas associée à la fraction du cytosquelette et le traitement à la dopamine n'affectait pas cet manque d'interaction. Nous n'avons pas retrouvé de **vinculine associée** à la fraction cytosquelettique. Tout comme la taline et la vinculine, l' **α -actinine** ne se trouvait pas associée à la fraction du cytosquelette et le traitement à la dopamine n'affectait pas cet manque d'interaction. À différence des autres protéines, la chaîne légère de la **myosine** était associée à la fraction de cytosquelette. Le traitement à la dopamine diminuait l'association de la myosine à la fraction soluble.

A



B



DISCUSSION

La dopamine et la bromocriptine, un agoniste dopaminergique D2, diminuent la taille des tumeurs hypophysaires qui sécrètent de la prolactine, les prolactinomes (Sobrinho et al., 1978; Thorner et al., 1980; Serri et al., 1983). Bien que les mécanismes et les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans cet effet demeurent encore inconnus, il a été démontré que la réduction de la taille de ces tumeurs implique une réduction de la taille des cellules lactotropes (Tindall et al., 1982; Hassoun et al., 1985), une involution rapide du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Luna et Hitt, 1992; Rengachary et al., 1982; Landolt et al., 1985) et que l'inhibition de la sécrétion de prolactine précède la réduction de la taille des cellules lactotropes tumorales (Thorner et al., 1980). Dans l'étude présente, nous avons démontré que la dopamine, via l'activation des récepteurs D2, induit des changements morphologiques importants sur les cellules lactotropes en culture, changements qui pourraient être reliés à la réduction de la taille des prolactinomes. Il est bien connu que la forme cellulaire dépend étroitement du cytosquelette d'actine. De plus notre laboratoire a démontré que le cytosquelette cortical d'actine est un site stratégique pour l'intégration des signaux multiples qui contrôlent la sécrétion de prolactine. En effet, le traitement de cellules lactotropes à la dopamine induit le réassemblage et la stabilisation des filaments corticaux d'actine et bloque le désassemblage induit par les stimulateurs de la sécrétion de prolactine (Carbajal et Vitale, 1997). Ici nous avons complété ces travaux, en démontrant que la dopamine cause la dépolymérisation des fibres cytoplasmiques d'actine et provoque l'arrondissement de ces cellules.

1. Effet de la dopamine sur le cytosquelette d'actine et la forme des cellules lactotropes

Nos résultats expérimentaux montrent que la dopamine induit le désassemblage des filaments cytoplasmiques d'actine des cellules lactotropes et que ceci est toujours suivi de l'arrondissement de ces cellules. Nos études dose-réponse et cinétiques de ces effets de la dopamine sur la morphologie des cellules lactotropes et non-lactotropes ont démontré que 1) les cellules lactotropes en culture ont tendance à s'aplatir dans le temps, contrairement aux cellules non-lactotropes qui maintiennent un phénotype arrondi pour des périodes en culture aussi longues que 96 heures, 2) la présence de dopamine dans le milieu de culture maintient le phénotype arrondi des cellules lactotropes, 3) la dopamine induit des changements de la forme cellulaire des lactotropes à des concentrations aussi basses que 50 nM, ce qui correspond aux concentrations de dopamine présentes dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Ben-Jonathan et al., 1977), 4) l'effet de la dopamine est toujours maximal: les cellules sont affectées ou elles ne le sont pas, 5) l'effet de la dopamine sur la forme des cellules lactotropes est plutôt lente, le traitement à la dopamine augmente le nombre de cellules arrondies seulement après une période d'incubation de 4 heures, et 6) l'effet de la dopamine est réversible et les cellules lactotropes nécessitent la présence constante de dopamine pour garder leur phénotype arrondi.

La dopamine affecte uniquement la forme des cellules lactotropes. L'hypophyse antérieure possède six classes de cellules dont cinq d'entre elles

sécrètent des hormones. L'étude dose-réponse de l'effet de la dopamine sur la forme des cellules a démontré que la forme des cellules non-lactotropes hypophysaires (cellules immunonégatives pour l'anticorps anti-PRL) n'est pas affectée par les traitements à la dopamine et cela même pour des concentrations aussi élevées que 5 μ M. Cela signifie que les changements de la forme cellulaire induits par la dopamine se retrouvent exclusivement dans les cellules lactotropes. De plus, l'étude cinétique de l'effet de la dopamine sur des cultures enrichies en cellules lactotropes nous a permis de conclure que la dopamine a un effet direct sur les cellules lactotropes et donc n'implique pas la participation d'autres cellules de l'hypophyse.

La concentration de dopamine dans les vaisseaux porte hypothalamo-hypophysaires est autour de 10-50 nM (Ben-Jonathan et al., 1977). Nous avons observé qu'à des concentrations aussi basses que 50 nM, la dopamine induit des changements de la forme des cellules lactotropes en culture. Comme cette concentration de dopamine correspond aux concentrations présentes dans le système porte, l'effet de la dopamine sur les cellules lactotropes est un effet physiologique. Cela suggère que dans les cellules lactotropes la dépolymérisation des fibres cytoplasmiques d'actine et le maintien de la forme arrondie font partie des mécanismes impliqués dans l'inhibition de la sécrétion de prolactine induite par la dopamine.

L'effet de la dopamine est toujours maximal: 80% des cellules lactotropes sont affectées. L'absence, la perte ou la défectuosité des récepteurs dopaminergiques D2 à la surface d'un certain pourcentage de cellules lactotropes (20%) sont les causes

majeures pour lesquelles certaines cellules lactotropes ne réagissent pas à l'effet de la dopamine. Cependant, il a été décrit qu'il existe une sous-population (10-20%) qui ne répondent pas à la dopamine (Wynck et al., 1993). Cette sous-population ne changerait pas de forme cellulaire lors d'un traitement à la dopamine. Aux concentrations physiologiques, la dopamine occupe plus de 80% des récepteurs dopaminergiques D2 à la surface des cellules lactotropes (Martin et al., 1984). À des concentrations plus basses que la concentration physiologique, la dopamine se dissocie rapidement de ses récepteurs et elle n'affecte plus les cellules lactotropes (Cronin et al., 1978). Cette situation explique l'effet réversible de la dopamine et que les cellules lactotropes nécessitent la présence constante de dopamine pour garder leur phénotype arrondi.

Nos études cinétiques ont démontré que les cellules lactotropes en culture ont tendance à s'aplatir dans le temps. La présence de dopamine dans le milieu de culture maintient le phénotype arrondi de ces cellules. Cet effet de la dopamine sur la forme des cellules lactotropes est lent, une baisse significative du nombre de cellules lactotropes aplaties est évidente seulement après une période d'incubation de 4 heures. À l'opposé, le traitement avec des facteurs de croissance modifie la morphologie des macrophages, des fibroblastes et cellules neuronales en quelques minutes (Allen et al., 1997; Ridley et Hall, 1992; Jalink et Moolenaar, 1992). Par exemple Allen et al. (1997) ont démontré que la présence de facteurs de croissance induit en quelques minutes le réassemblage des filaments d'actine et la contraction cellulaire de la lignée cellulaire de macrophages Bacl. Dans les fibroblastes Swiss

3T3, les changements morphologiques induits par les facteurs de croissance sont aussi très rapides.

2. Les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'arrondissement des cellules lactotropes induit par la dopamine.

Nous avons par la suite étudié les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'arrondissement des cellules lactotropes induits par la dopamine. À des concentrations similaires à la dopamine, la bromocriptine, un agoniste des récepteurs D2, induit les mêmes changements sur la forme cellulaire et le cytosquelette d'actine des cellules lactotropes que la dopamine. Cela indique que l'effet de la dopamine implique l'activation des récepteurs D2 des cellules lactotropes. Il est connu que la stimulation des récepteurs dopaminergiques D2, via l'interaction avec des protéines G hétérotrimétriques, inhibe l'adénylate cyclase et diminue les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} (Ben-Jonathan, 1985; Swennen et al., 1982). Les voies intracellulaires dépendant de l'AMPc jouent un rôle majeur dans l'activité sécrétrice et la croissance des cellules lactotropes. Des études ont démontré que l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc ou de ses analogues stimule la sécrétion de prolactine (Delbeke et al., 1984; Hall et al., 1976; Tam et Dannies, 1974). Cependant cet effet singulier n'est pas suffisant pour moduler la synthèse et la sécrétion de prolactine (Lafond et Collu, 1986; Delbeke et al., 1986; Sanyal et Van Tol, 1997). Le Ca^{2+} participe aussi au contrôle de l'activité

sécrétrice des cellules lactotropes (Stojilkovic et al., 1988). L'administration de substances qui augmentent la concentration de Ca^{2+} tel les ionophores de Ca^{2+} (Delbeke et Dannies, 1985; Schettini et al., 1983), la maitoxin activateur des canaux de Ca^{2+} (Judd et al., 1985; Koike et al., 1986), et BAY K 8644 (Cronin et al., 1985; Enyear et al., 1988), stimulent la sécrétion de prolactine par des lignées cellulaires hypophysaires, GH et MMQ. À l'opposé, une diminution des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} ou l'administration de bloqueurs de canaux de Ca^{2+} inhibent la sécrétion de prolactine (Judd et al., 1985; Login et al., 1985). Dans des études récentes, notre laboratoire a démontré que l'augmentation d'AMPc et le Ca^{2+} sont impliqués dans le désassemblage de l'actine cortical qui facilite l'exocytose des granules de sécrétion contenant de la prolactine (Carbajal et Vitale, 1997). Dans l'étude présente, nous avons démontré que l'inhibition de synthèse de l'AMPc et de l'entrée de Ca^{2+} sont impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et le maintien d'une forme cellulaire arrondie.

A) Rôle de l'AMPc dans les changements morphologiques induits par la dopamine dans les cellules lactotropes.

L'incubation des cellules lactotropes avec le KT5720, un inhibiteur de l'activité de la PKA (Gadbois et al., 1992; Cabell et Audersirk, 1993), induit les mêmes effets que la dopamine c'est-à-dire, le KT5720 maintient le phénotype arrondi des cellules lactotropes en culture et induit le désassemblage des filaments d'actine cytoplasmique de ces cellules. L'étude dose-réponse de l'effet de du KT5720 sur la

forme des cellules lactotropes a démontré que le KT5720 affecte environ 60% des cellules lactotropes. Des concentrations plus élevées de KT5720 n'induisent pas une augmentation encore plus élevée du pourcentage des cellules rondes. Ceci suggère que certaines cellules lactotropes ne sont pas sensibles au KT5720 ou bien que dans une certaine population de cellules lactotropes l'inhibition de la PKA ne conduit pas à l'acquisition d'un phénotype arrondi. De plus, la dopamine est plus puissante que le KT5720 pour inhiber l'apparition des cellules aplaties, il y a donc un pourcentage de cellules lactotropes où l'induction de la forme arrondie par la dopamine n'impliquerait pas l'activation de la PKA.

La forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, qui donc active indirectement la PKA, et le 8-BrAMPc, un analogue de l'AMPc perméable à la membrane plasmique, ont un effet contraire à la dopamine. Nos résultats montrent que la forskoline, à des concentrations de 1 à 10 μ M, et le 8-BrAMPc à des concentrations de 2,5mM, accélèrent l'apparition du phénotype polygonale des cellules lactotropes qui a lieu en l'absence de dopamine du milieu de culture. *In vitro*, 10 μ M de forskoline induit une augmentation de l'AMPc intracellulaire semblable à celle produite par une concentration physiologique de VIP (Elzey, 1985). L'effet de la forskoline tout comme celui de la dopamine, est indépendant de la présence d'autres types cellulaires dans les cultures. De plus, nous avons démontré que la forskoline est capable de renverser l'effet de la dopamine et cela même lorsque les cellules sont déjà arrondies. Ainsi, nos résultats démontrent que **(a)** la diminution d'AMPc

intracellulaire induit par dopamine, via l'activation des récepteurs dopaminergique D2, est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'arrondissement des cellules lactotropes, **(b)** l'augmentation intracellulaire d'AMPc, qui augmente l'activité sécrétrice et la synthèse de prolactine, est aussi associée à la croissance et l'étalement des cellules lactotropes et **(c)** l'augmentation de l'AMPc antagonise les effets de la dopamine.

B) Le rôle du Ca^{2+} dans les changements morphologiques induits par la dopamine dans les cellules lactotropes.

Pour étudier l'implication du Ca^{2+} dans la dépolymérisation des fibres cytoplasmiques d'actine et l'arrondissement des lactotropes induits par la dopamine, nous avons incubé les cultures de cellules hypophysaires avec la nifedipine. La nifedipine est un inhibiteur des canaux calciques de type L. Cette substance induit les mêmes effets que la dopamine, c'est-à-dire, la nifedipine prévient l'apparition du phénotype aplati dans les cellules lactotropes. La nifedipine est aussi puissante que la dopamine pour inhiber l'apparition des cellules aplaties, ce qui nous indique que l'inhibition des canaux calciques de type L est impliquée dans l'induction et le maintien du phénotype arrondi induits par la dopamine. La forskoline bloque l'apparition du phénotype arrondi induite par la nifedipine et la nifedipine bloque l'apparition du phénotype aplati induite par la forskoline. Cela suggère que la forskoline requiert l'entrée de Ca^{2+} pour induire le phénotype aplati. Cependant, le phénotype aplati induit par l'AMPc n'est pas bloqué par la dopamine, ce qui suggère que l'étape sensible à la dopamine se

retrouve en amont des processus dépendant de l'AMPc. En résumé, nos résultats expérimentaux suggèrent que le cytosquelette d'actine et la forme des cellules lactotropes sont sensibles aux régulateurs de la sécrétion de prolactine en particulier la dopamine. Ces effets de la dopamine impliquent une diminution des concentrations intracellulaire de l'AMPc et de l'entrée du Ca^{2+} .

C) Le rôle de la phospholipase C dans les changements morphologiques induits par la dopamine dans les cellules lactotropes.

Le mécanisme dopaminergique d'inhibition de la sécrétion de la prolactine est complexe et implique plusieurs messagers secondaires autres que l'AMPc et le Ca^{2+} (Ben-Jonathan, 1985). On sait, en effet que l'activation des récepteurs dopaminergiques D2 inhibe aussi l'activité de la phospholipase C (PLC) (Enjalbert et al., 1986; Bockaert et al., 1988). La phospholipase C est un élément essentiel de la voie intracellulaire phosphatidylinositol 4, 5-diphosphate (PIP_2) / protéine kinase C (PKC) qui d'ailleurs participent à la régulation de la synthèse et la sécrétion de prolactine (Kelly et al., 1988; Pizzi et al., 1988). La liaison de la dopamine à son récepteur déclenche l'activation d'une protéine G qui va, de son côté, inhiber la phospholipase C. Cet enzyme clive le PIP_2 en inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP_3) et 1, 2-diacylglycérol. L' IP_3 diffuse dans le cytosol et atteint la membrane du réticulum endoplasmique et provoque la libération de Ca^{2+} . Le 1, 2-diacylglycérol reste ancré à la membrane, là, de concert avec la Ca^{2+} , il induit l'activation de la PKC. Dans les

cellules lactotropes, la TRH, un activateur de la phospholipase C, stimule la sécrétion de prolactine via la production de diacylglycérol et de IP_3 . Des études récentes ont démontré que dans cellules lactotropes normales (Ballester et Rosen, 1985; Delbeke et al., 1985), et tumorales GH₃ (Kolesnick et Gershengorn, 1984) et MMQ (Judd et al., 1988) l'activation de la PKC stimule la sécrétion de prolactine. De plus, certains auteurs ont démontré que dans les cultures primaires de cellules hypophysaires, l'inhibition de l'expression du gène de prolactine induite par la dopamine implique la participation de PKC (Chuang et al., 1993). Pour connaître l'implication de cette voie de signalisation intracellulaire dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'arrondissement des cellules lactotropes induits par la dopamine, nous avons traité les cellules avec de la néomycine, une substance inhibitrice de la phospholipase C (Ossulakova et al., 1976; Carney et al., 1985). La néomycine induit les mêmes effets morphologiques dans les cellules lactotropes que la dopamine, c'est-à-dire, une dissolution des filaments d'actine du cytoplasme et l'arrondissement des cellules. Vallard et col. (1988) ont démontré que les récepteurs dopaminergiques D2 ne sont pas couplés directement à la phospholipase C. Leurs résultats indiquent que l'augmentation de IP_3 induite par la TRH n'est pas diminué par la dopamine, cela suggère qu'un facteur cytosolique, certainement le Ca^{2+} , précède l'action de la dopamine sur le métabolisme des phosphoinosités. D'autre part, certains auteurs ont démontré que dans les cellules lactotropes, l'incubation avec la dopamine inhibe la sécrétion de prolactine et l'activité de la PKC en diminuant les concentrations intracellulaires de PIP_2 hydrolysés (Jarvis et al., 1988). Nos résultats montrent que la

néomycine maintient la forme arrondie des cellules lactotropes mais qu'elle est moins puissante que la dopamine. En effet, après incubation avec la néomycine, 60% des cellules présente le phénotype arrondi versus 78% de cellules après l'incubation avec la dopamine. De plus, nous avons démontré que la forskoline est capable de renverser l'effet de la néomycine, cela suggère que l'augmentation de l'AMPc intracellulaire inhibe l'apparition du phénotype arrondi induite par l'inhibition de la PLC. Par contre, la néomycine, tout comme la dopamine, ne bloque pas l'induction du phénotype aplati induite par la forskoline. Ces résultats suggèrent que (1) la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'arrondissement des cellules lactotropes induits par la dopamine pourraient impliquer l'inhibition de la PLC; (2) ceci serait vrai pour un pourcentage de cellules lactotropes; (3) l'effet de la forskoline, qui stimule l'adénylate cyclase, annule l'effet de l'inhibition de l'activité de la phospholipase C, ce qui suggère que l'étape qui dépend de l'AMPc est en aval de celle dépendante de la PLC.

D) Le rôle de la petite GTPase Rho dans les changements morphologiques induits par la dopamine dans les cellules lactotropes.

Dans la plupart des cellules, les facteurs de croissance induisent des changements morphologiques semblables à ceux observés lors de notre étude, via la

participation de la petite protéine G rho. Rho est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et de ce fait, elle régularise la forme cellulaire (Hall, 1994; Takai et al., 1995). Dans plusieurs types de cellulaires, l'activation de rho induit l'étalement des cellules, de même que la formation des fibres de stress et de contacts focaux (Hall, 1994). Puisque l'arrondissement des cellules lactotropes induit par la dopamine implique la réorganisation du cytosquelette d'actine, nous avons évalué la possibilité que des mécanismes dépendants de rho y participent. L'incubation de cellules lactotropes avec *Clostridium botulinum* C3, une exoenzyme qui inactive les protéines rho en catalysant leur ADP ribosylation (Aktories et al., 1989; Sekine et al., 1989), induit le désassemblage des filaments d'actine cytoplasmique et l'arrondissement des cellules lactotropes, deux effets morphologiques semblables aux effets de la dopamine. Tout comme dans les cellules lactotropes, l'inactivation de rho par le traitement à la C3 induit la dissolution des fibres de stress et l'arrondissement des cellules ostéoblastiques, des fibroblastes, et des cardiomyocytes (Hall, 1994; Takai et al., 1995; Wang et al., 1997; Paterson et al., 1990). À l'opposé, le traitement au C3 induit l'étalement des astrocytes, des macrophages et des lignées cellulaires neuronales (Chardin et al., 1989). Encore une fois, l'augmentation du pourcentage de cellules lactotropes arrondies induite par la C3 est inférieure à celle induite par la dopamine. Cela peut être dû au fait que toutes les cellules n'ont pu incorporer la C3 ou bien que dans certaines cellules lactotropes l'inactivation de rho ne conduit pas à la réorganisation du cytosquelette d'actine et au changement de la forme cellulaire. La forskoline bloque l'arrondissement des lactotropes induit par la C3, mais la C3, tout

comme la dopamine, ne bloque pas l'induction du phénotype aplatie induite par la forskoline. Cela suggère que l'étape sensible à rho se retrouve en amont de l'étape sensible à l'AMPC. Ainsi, nos résultats suggèrent que la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'arrondissement des cellules lactotropes induits par la dopamine impliquerait l'inhibition de la petite protéine rho, tout au moins dans un pourcentage de cellules lactotropes.

E) Participation des tyrosine kinases dans l'arrondissement des cellules lactotropes induit par la dopamine.

L'incubation de cellules lactotropes avec la dopamine induit le réassemblage et la stabilisation des filaments corticaux d'actine (Carbajal et Vitale, 1997). Nous avons observé ici que la dopamine induit aussi la dissolution des filaments d'actine du cytoplasme et l'arrondissement de ces cellules lactotropes. Le cytosquelette cytoplasmique d'actine se prolonge jusqu'aux contacts focaux, endroits d'attachement de la membrane plasmique au substrat. Ces contacts focaux contiennent un complexe de protéines formé de tyrosines kinases, de kinases associées aux contacts focaux (FAK) et de protéines d'ancrage des filaments d'actine. Comme nos études démontrent que la dopamine dissout les fibres d'actine du cytoplasme de cellules lactotropes, nous avons cherché à déterminer s'il était possible que des tyrosines kinases soient impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'arrondissement des lactotropes induits par la dopamine. Nous avons traité les

cultures de cellules hypophysaires avec la génistéine, une substance qui inhibe l'activité des tyrosines kinases (Akiyama et al., 1987). *In vitro*, la génistéine à des concentrations de 10 ou 30 μM inhibe de façon spécifique l'activité des tyrosines kinases, et affecte très peu l'activité des PKA et PKC (Akiyama et al., 1987). Des études ont démontré que la génistéine bloque l'assemblage des contacts focaux et des fibres de stress induit par l'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC) ou stimulé par l'activation de protéine rho (Burridge et al., 1992; Chrzanoska-Wodnicka et Burridge, 1994; Roomer et al., 1994). Kanda et al., (1994) ont démontré que dans les cellules hypophysaires tumorales GH3 le traitement au ST638, un inhibiteur des tyrosines kinase, inhibe la sécrétion de prolactine et inhibe l'activité des tyrosines kinases MAP. Leurs résultats suggèrent l'activité sécrétrise induite par la TRH implique la participation des tyrosine kinases MAP.

Dans notre cas, l'incubation des cultures de cellules lactotropes avec la génistéine cause le désassemblage des filaments d'actine cytoplasmique et l'arrondissement des cellules lactotropes, deux effets semblables à ceux de la dopamine. Cependant, la génistéine est moins puissante que la dopamine pour maintenir le phénotype arrondi. En accord avec ces résultats, l'incubation simultanée des cellules avec la dopamine et la génistéine induit l'apparition du même pourcentage de cellules arrondies que l'incubation de cellules seulement avec la dopamine. De plus, nos résultats démontrent que la forskoline inhibe l'effet de la génistéine, mais la génistéine ne bloque pas l'apparition du phénotype aplati induit par la forskoline. En résumé, nos résultats suggèrent que (1) la réorganisation du

cytosquelette d'actine et l'arrondissement des cellules lactotropes induits par la dopamine pourrait impliquer l'inhibition des tyrosines kinases; (2) cependant, l'inhibition des tyrosine kinases induirait le phénotype arrondi seulement dans certaines cellules lactotropes; et (3) la forskoline bloque l'effet de l'inhibiteur des tyrosines kinases ce qui suggère que l'étape qui dépend de l'AMPc est en aval de celle dépendante de l'activité des tyrosines kinases.

3. ÉTUDE DE L'EFFET DE LA DOPAMINE SUR L'EXPRESSION ET LA LOCALISATION DE QUATRE PROTÉINES D'ANCRAGE DES FILAMENTS D'ACTINE : LA TALINE, LA VINCULINE, L' α -ACTININE ET LA MYOSINE II.

L'inhibition de la sécrétion de prolactine induite par la dopamine est accompagnée du réassemblage des filaments corticaux d'actine (Carbajal et Vitale, 1997) et de la dépolymérisation des filaments cytoplasmique (ce travail). À l'échelon moléculaire, cette réorganisation du cytosquelette d'actine peut être due à des variations dans l'expression des protéines de liaison à l'actine tel celles qui régularisent la longueur des microfilaments, leur réticulation, leur organisation en faisceau, leur ancrage à la membrane et/ou à des modifications dans leur distribution subcellulaire. Puisque la dopamine affecte la forme cellulaire, nous avons choisi d'étudier l'effet de la dopamine sur l'expression et la localisation (association / dissociation à la membrane plasmique et / ou au cytosquelette) des protéines qui affectent l'architecture spatiale des filaments d'actine tel les protéines d'ancrage des filaments d'actine.

Les cellules lactotropes en culture expriment les quatre protéines d'ancrage suivantes: la taline, la vinculine, l' α -actinine et la myosine. Par contre les cellules lactotropes en culture n'expriment pas la spectrine ni la filamine. La vinculine et la taline sont les composantes majeurs des contacts focaux où elles sont liées directement l'une à l'autre avec une affinité relativement élevée ($K_d = 10^{-8}$ M) (Burridge et Mangeat, 1984). La taline s'associe à la vinculine et la vinculine à la l' α -actinine (Burridge et Mangeat, 1994; Wachsstock et col., 1987). La vinculine et la taline sont impliquées dans l'ancrage des filaments d'actine à la membrane plasmique (Geiger et col., 1987; Burridge et col., 1988; Otto, 1990).

La taline (PM 225 kDa) joue un rôle important dans l'établissement jonctions cellule-matrice au niveau de l'attachement des filaments d'actine à la membrane (Berkerle et Yeh, 1990). La taline est une protéine essentiel dans le développement des contacts focaux (Nuckolls et col., 1992). Les études d'Otto (1990) ont démontré que la taline se retrouve et agit principalement dans les contacts focaux, mais elle est aussi présente dans le cytosol sous forme de pool soluble. Muguruma et col. (1992) ont démontré que (a) la taline peut se lier directement aux filaments d'actine, (b) ce complexe interagit avec la membrane plasmique via la liaison de la taline avec des intégrines spécifiques, et (c) l'association taline-membrane peut induire la polymérisation d'actine. Dans les plaquettes, des cellules spécialisées dans l'adhésion, on retrouve une large quantité de protéines qui composent les plaques d'adhésion. Les plaquettes présentent des concentrations élevées de taline, de

vinculine et d' α -actinine, et d'intégrines à leurs surfaces. La taline est l'une des protéines les plus abondantes, elle représente environ 3% de la quantité totale de protéines présentes dans les plaquettes. Beckerly et col. (1989) ont démontré que dans des plaquettes non-adhésives, c'est-à-dire au repos, la taline est présente dans le cytoplasme, alors que la stimulation de ces plaquettes induit une translocation de la taline à la membrane plasmique.

L'anticorps monoclonal que nous avons utilisé dans nos études pour détecter la taline sur des immunoblots montre deux bandes dans les cellules lactotropes en culture: une bande supérieure de 230 kDa correspondant à la protéine complète et une bande inférieure de 195 kDa correspondant à un fragment clivé par une enzyme, la calpaine dont l'activité est régulée par le Ca^{2+} . Nos résultats indiquent que le traitement à la dopamine (1) inhibe le clivage de la taline, cet effet serait dû à l'inhibition de l'entrée de calcium par la dopamine, (2) s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la taline, et que cette taline reste toujours associée la membrane. Nos résultats expérimentaux montrent aussi que la taline ne se trouve pas associée à la fraction du cytosquelette des cellules lactotropes et que le traitement à la dopamine n'effecte pas cette manque d'interaction. Nos résultats suggèrent que l'augmentation de la taline associée à la membrane procurerait un meilleure ancrage des filaments d'actine à la membrane plasmique et ceci contribuerait à augmenter la rigidité des filaments d'actine corticaux des cellules lactotropes incubées avec la dopamine.

La vinculine (PM 120k Da) est un élément clef dans les assemblages transmembranaires qui lient les membranes aux filaments ou les cellules entre elles (Westmeyer et col., 1990). De plus, des études ont démontré que (a) la vinculine possède un domaine liant l'actine (Menkel et col., 1994; Jonhson et Craig, 1995), (b) la protéine joue le rôle du ligand pour le complexe d'adhésion focal de la protéine paxilline (Turner et col., 1990), (c) la vinculine se lie de façon non covalente à la bicouche de phospholipides (Niggli et Burger, 1987), et (d) la protéine interagit avec le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (Fukami et col., 1994). La vinculine est donc très importante dans les mécanismes d'attachement et d'étalement des cellules. Dans les cellules F9vin (-/-), une variété des cellules F9 qui n'exprime pas la vinculine, la perte de vinculine induit l'arrondissement des cellules, une diminution de l'adhésion cellulaire et une augmentation de la motilité (Volberg et col., 1995). D'autres part, certains auteurs ont démontré que le niveau d'expression de la vinculine influence directement la formation des contacts focaux, la motilité et la maintenance de la forme cellulaire (Samuels et col., 1993). Rodriguez et col. (1992) ont démontré que la surexpression de vinculine dans les fibroblaste 3T3 de souris diminue la locomotion de ces cellules.

Dans les cellules lactotropes en culture, le traitement à la dopamine n'affecte pas l'expression de vinculine et qui d'ailleurs reste toujours à la fraction membranaire. Nos résultats expérimentaux montrent aussi que la vinculine ne se trouve pas associée à la fraction du cytosquelette des cellules lactotropes et que le traitement à la dopamine n'effecte pas cette manque d'interaction. Ces résultats

suggèrent que dans les cellules lactotropes, la vinculine ne serait pas impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et dans l'arrondissement des cellules lactotropes induits par la dopamine.

L' α -actinine (PM 100 kDa) forme des liaisons croisées avec les filaments d'actine (Podlubnaya et col., 1975). Dans les cellules non musculaires, l' α -actinine, sous forme de dimère (deux sous-unité de 100 kDa), lie les filaments d'actine en rang linéaire comme dans les fibres de stress et cette association entre l' α -actinine et l'actine est influencée par les concentrations intracellulaire de Ca^{2+} (Burrige et Feramisco, 1981; Poolard, 1981). Dans les cellules non-musculaires telle les cellules chromaffines, l' α -actinine est aussi associée aux granules de sécrétion (Bader et Aunis, 1983). Il est connu que les membranes des granules de chromaffines stimulent la dépolymérisation de l'actine et lient les filaments d'actine (Bader et Aunis, 1983). Dans les cellules lactotropes, le traitement à la dopamine induit une augmentation de l'expression de l' α -actinine, celle-ci demeure associée à la fraction cytosolique. Nos résultats expérimentaux montrent aussi que la l' α -actinine ne se trouve pas associée à la fraction du cytosquelette des cellules lactotropes et que le traitement à la dopamine n'effecte pas cette manque d'interaction. La présence de l' α -actinine dans la fraction cytosolique suggère que l'augmentation de l'expression de l' α -actinine ne contribuerait pas à la rigidité des filaments d'actine corticaux induit par la dopamine.

La **myosine** se trouve toujours là où les filaments d'actine forment des faisceaux contractiles. La myosine II des cellules non musculaires est formée par deux chaînes

lourdes identiques (queue), d'un poids moléculaire de 230 kDa chacune, et deux paires de chaînes légères de deux types (tête), d'un poids moléculaire proche de 20 kDa chacune. La tête globuleuse permet à la myosine II de se fixer à l'actine et le segment fibreux lui permet de s'associer en filaments avec d'autres molécules. Dans les cellules non musculaires, la phosphorylation de l'une des deux **chaînes légères de myosine** (PM 20 kDa), qui à son tour, contrôle l'interaction de la myosine avec l'actine, régularise des fonctions spécifiques de la cellule telle la contraction (Wysolmerski et Lagunoff, 1991), la motilité cellulaire (Wilson et col., 1991) et le fonctionnement de la barrière épithéliale (Hecht et col., 1996). Dans les cellules astrocytes 1321N1, la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine via la participation des petites protéines rho induit l'arrondissement de ces cellules.

Nous avons observé que dans les cellules lactotropes en culture, la myosine est associée aux fractions cytosoliques, cytosquelettique et membranaires. Le traitement à la dopamine diminue l'association de la chaîne légère de la myosine à la fraction non-cytosquelettique. Cette diminution serait conséquence de la dissolution des filaments d'actine cytoplasmique. Nos résultats expérimentaux suggèrent donc que la myosine du cytosol serait impliquée dans la formation de fibres cytosoliques d'actine en absence de dopamine.

CONCLUSION

En conclusion, nous avons démontré dans l'étude présente que le traitement à la dopamine des cellules hypophysaires en culture induit des changements morphologiques importants exclusivement dans les cellules lactotropes. Ces changements impliquent une réorganisation du cytosquelette d'actine, c'est-à-dire, le désassemblage des filaments cytoplasmique d'actine (étude présente), et le réassemblage et la stabilisation des filaments corticaux d'actine (Carbajal et Vitale, 1997). Comme résultat final de ses remaniments du cytosquelette d'actine par la dopamine, les cellules lactotropes gardent une forme arrondie. Nos résultats suggèrent que plusieurs seconds messagers seraient impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et le maintien d'une forme cellulaire arrondi induits par la dopamine dans les cellules lactotropes. Ces messagers sont l'inhibition de la synthèse de l'AMPC, la réduction des concentrations intracellulaire de Ca^{2+} , l'inactivation de la protéine G rho, l'inhibition de la PLC et l'inhibition des tyrosines kinases. De plus, la stabilisation du cytosquelette cortical et la dissolution des fibres cytoplasmiques d'actine induites par la dopamine pourraient être le résultat d'une augmentation de l'association à la membrane de certaines protéines d'ancrage telle la taline et la dissociation de la myosine à l'actine.

REFERENCES

Abe H, Engler D, Molitch M, Bollinger-Gruber J, Reichlin S (1985) Vasoactive intestinal peptide is a physiological mediator of PRL release in the rat. *Endocrinology* **116**, 1383-1390.

Aguilera G, Hyde CL, Catt KJ (1982) Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactotrophs. *Endocrinology* **111**, 1045-1050.

Akiyama T, Ishida J, Nakayama S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine specific protein kinase. *J Biol Chem* **262**, 5592-5595.

Akiyama T, Ogawara H (1991) Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinase. *Methods Enzymology* **201**, 362-370.

Aktorics K, Braun U, Rösener S, Just I, Hall A (1989) The rho gene product expresses in E.coli is a substrate of botulinum ADP-ribotransferase C3. *Biochem Biophys Res Commun* **158**, 209-213.

Allen WE, Jones GE, Pollard JW, Ridley AJ (1997) Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J Cell Sci* **110**, 707-720.

Allaerts W, Jeuken PHM, Debels R, Hoefakker S, Claassen E, Drexhage HA (1997) Heterogeneity of pituitary follicule-stellate cells : implications of interleukine-6 production and accessory function in vitro. *J Neuroendocrinol* **9**, 43-53.

Arnaout MA, Garthwaite TL, Martinson DR, Hagen TC (1986) Vasoactive intestinal polypeptide is synthesized in anterior pituitary tissue. *Endocrinology* **119**, 2052-2057.

Aub DL, Frey EA, Sekura RD, Cote TE (1986) Coupling of the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase by a GTP-binding protein distinct from the inhibitory or stimulatory GTP-binding protein. *J Biol Chem* **261**, 9333-9340.

Aunis D, Perrin D (1984) Chromaffin granule-membrane F-actin interactions and spectrin-like protein of subcellular organelles : a possible relationship. *J Neurochem* **42**, 1558-1569.

Baes M, Allaerts W, Deneff C (1987) Evidence for functional communication between folliculo-stellate cells and hormone-secreting cells in perfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology* **120**, 685-691.

Baker BL, Yu YY (1977) An immunocytochemical study of human pituitary mammotropes from fetal life to old age. *Am J Anat* **148**, 217-240.

Ballester R, Rosen OM (1985) Fate of immunoprecipitable protein kinase C GH3 cells treated with phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem* **260**, 15194-15199.

Baribault H, Blouin R, Bourgon L, Marceau N (1989) Epidermal growth factor-induced selective phosphorylation of cultured rat hepatocyte 55kD cytokeratin before filament reorganization and DNA synthesis. *J Cell Biol* **109**, 1665-1676.

Bataille D, Peillon F, Besson J, Rosselin G (1979) Vasoactive intestinal peptide (VIP) : Récepteurs spécifiques et activation de l'adénylate cyclase dans une tumeur hypophysaire humaine à prolactine. *C.R. Hebd Seances Acad Sci Ser D Sci Nat* **288**, 1315-1317.

Begeot M, Hemming FJ, Martinat N, Dubois MP, Dubois PM (1983) Gonadotropin releasing hormone (GnRH) stimulates immunoreactive lactotrope differentiation. *Endocrinology* **112**, 2224-2226.

Bendayan M, Maestracci ND (1984) Pituitary adenomas : Patterns of hPRL and hGH secretion as revealed by high resolution immunocytochemistry. *Biol Cell* **52**, 129-138.

Ben-Jonathan N, Olivier C, Weiner JH, Mical RS, Porter JC (1977) Dopamine in hypophysial portal plasma of rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* **100**, 452-460.

Ben-Jonathan N, Neill MA, Arbogast LA, Peters LL, Hofer MT (1980) Dopamine in hypophysial portal blood : relationship to circulating prolactin in pregnant and lactating rats. *Endocrinology* **106**, 690-701.

Ben-Jonathan N (1985) Dopamine : A prolactin-inhibiting hormone. *Endocrine Rev* **6**, 564-588.

Bennet V (1992) The molecular basis for membrane-cytoskeleton association in human erythrocyte. *J Cell Biochem* **18**, 49-65.

Besson J, Rotsztejn WH, Bataille D (1972) Involvement of VIP in neuroendocrine functions. In : Vasoactive Intestinal Peptide, edited by Said SI. *Raven Press*, 253-262.

Bishop W, Krulich L, Fawcett CP, McCann SM (1971) The effect of median eminence lesions on plasma levels of FSH, LH and prolactin in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* **136**, 925-927.

Bjiro T, Wijk P, Opstad PK, Gautvik KM, Haug E (1987) Binding and degradation of vasoactive intestinal peptide in prolactin-producing cultured rat pituitary tumour cells (GH₄C₁). *Acta Physiol Scand* **130**, 609-618.

Bjoro T, Sand O, Ostberg BC, Gordeladze JO, Torjesen P, Gautvik KM, Haug E (1990) The mechanisms by which VIP and TRH stimulate prolactin release from pituitary cells. *Biosci Rep* **10**, 189-199.

Bockaert J, Journot L, Enjalbert A (1988) Second messengers associated with the action of angiotensin II and dopamine D2 receptors in anterior pituitary. Relationship with prolactin secretion. *J Recept Res* **8**, 2258-243.

Bollengier F, Velkeniers B, Hough PE, Mahler A, Vanhaelst L (1989) Multiple forms of rat prolactin and growth hormone in pituitary cell populations separated using Percoll gradient system : disulphide bridged dimers and glycosylated variants. *J Endocrinol* **120**, 201-206.

Bollengier F, Geerts A, Matton A, Malke A, Velkeniers B, Hoogh-Peters E, Vanhaelst L (1993) Identification and localization of 23000 and glycosylated rat prolactin. *J Neuroendocrinol* **5**, 669-676.

Borgeat P, Labrie F, Drouin J, Bélanger A, Immer H, Sestanj K, Nelson V, Szöts M, Schally AV, Coy DH, Coy EJ (1974) Inhibition of adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation in anterior pituitary gland in vitro by growth hormone release inhibiting hormone. *Biochem Biophys Res Commun* **56**, 1052-1059.

Bouvier C, Lagace G, Lafond J, Beauregard G, Potier M, Collu R (1987) Characterization of D₂ dopamine receptors in dopamine-resistant prolactin-secreting rat pituitary tumors 7315a and MtTW15. *J Neurochem* **49**, 1644-1650.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**, 248-254.

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.

Bruhn TD, Bolduc TG, Maclean DB, Jackson IMD (1991) ProTRH peptides synthesized and secreted by anterior pituitary cells in long-term culture. *Endocrinology* **129**, 556-558.

Burridge K, Feramisco JR (1981) Nonmuscle α -actinins are calcium-sensitive actin binding proteins. *Nature* **294**, 565-567.

Burridge K, Mangeat P (1984) An interaction between vinculin and talin. *Nature* **308**, 744-746.

Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls, G, Turner C (1988) Focal adhesions : transmembrane junctions between the extra-cellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 487-525.

Burridge K, Turner CE, Romer LH (1992) Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125¹²⁵ accompanies cell adhesion to extracellular matrix : a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol* **119**, 893-903.

Cabell L, Audesirk G (1993) Effects of selective inhibition of protein kinase C, cyclic AMP-dependent protein kinase, and Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase on neurite development in cultured rat hippocampal neurons. *Int J Dev Neurosci* **11**, 357-368.

Canonico PL, Valdenegro CA, MacLeod RM (1982) Dopamine inhibits ^{32}P i incorporation into phosphatidylinositol in the anterior pituitary gland of the rat. *Endocrinology* **111**, 347-349.

Canonico PL, Valdenegro CA, MacLeod RM (1983) The inhibition of phosphatidylinositol turnover : a possible postreceptor mechanism for the prolactin secretion-inhibiting effect of dopamine. *Endocrinology* **113**, 7-14.

Carbajal ME, Vitale ML (1997) The cortical actin cytoskeleton of lactotropes as an intracellular target for the control of prolactin secretion. *Endocrinology* **138**, 5374-5383.

Caron MG, Kilpatrick BF, McDonald WM (1985) The dopamine receptor of the anterior pituitary gland : Involvement of a guanine nucleotide-sensitive agonist high affinity form of the receptor in the mechanism of action of dopamine. In : Catecholamines as Hormone Regulators, edited by Ben-Jonathan N, Bahr JM, and Weiner RI, *Raven Press*, 89-98.

Champier J, Claustrat B, Harthe C, Chevalier P, Trouillas J (1992) Concanavalin-A bound and unbound prolactin in normal and hyperprolactinemic rats. *J Endocrinol* **134**, 27-32.

Chardin P, Boquet P, Madaule P, Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM (1989) The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilament in Vero cells. *EMBO J* **8**, 1087-1092.

Cheek TR, Burgoyne RD (1986) Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett* **207**, 110-114.

Cheever FV, Lewis UJ (1969) Estimation of the molecular weight of the multiple components of GH and PRL. *Endocrinology* **85**, 465-473.

Chen CL, Amenomori Y, Lu KH, Voogt JL, Meites J (1970) Serum prolactin levels in rats with pituitary transplants or hypothalamic lesions. *Neuroendocrinology* **6**, 220-227.

Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K (1994) Tyrosine phosphorylation is involved in reorganization of the actin cytoskeleton in response to serum or LPA stimulation. *J Cell Sci* **107**, 3643-3654.

Chuang TT, Caccavelli L, Kordon C, Enjalbert A (1992) Protein kinase C regulation of prolactin gene expression in lactotroph cells : involvement in dopamine inhibition. *Endocrinology* **132**, 832-838.

Cronin MJ, Roberts JM, Weiner RI (1978) Dopamine and dihydroergocryptine binding to the anterior pituitary and other brain areas of the rat and sheep. *Endocrinology* **103**, 302-311.

Dada MO, Campbell GT, Blake CA (1984) Pars distalis cell quantification in normal adult male and female rats. *J Endocrinol* **101**, 87-94.

De Camilli P, Macconi D, Spada A (1979) Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin-secreting pituitary adenomas. *Nature* **278**, 252-254.

de Greef WJ, Plotsky PM, Neill JD (1981) Dopamine levels in hypophyseal stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat : effects of simulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology* **32**, 229-233.

de Greef WJ, Visser TJ (1981) Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotrophin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J Endocrinol* **91**, 213-223.

Delahunty TM, Cronin MJ, Linden JM (1988) Regulation of GH₃ cell function by the adenosine A₁ receptor : inhibition of prolactin release, cyclic AMP production, and inositol phosphate generation. *Biochem J* **255**, 59-77.

Delbeke D, Dannies PS (1981) Stimulation of adenosine 3', 5' monophosphate and the Ca²⁺ messenger system together reverse dopaminergic inhibition of prolactin release. *Endocrinology* **117**, 439-446.

Delbeke D, Kojima I, Dannies PS, Rasmusen H (1984) Synergistic stimulation of prolactin release by phorbol ester, A23187 and forskoline. *Biophys Res Commun* **123**, 735-741.

Delbeke D, Kojima I, Dannies PS, (1985) Comparaison of patterns of prolactin release in GH₄ C₁ cells and primary pituitary cultures. *Mol Cell Endocrinol* **43**, 15-22.

Delbeke D, Scammell JG, Martinez-Campos A, Dannies PS (1986) Dopamine inhibits prolactin release when cyclic AMP levels are elevated. *Endocrinology* **118**, 1271-1279.

Denef C (1981) LHRH stimulates prolactin release from rat pituitary lactotrophs co-cultured with a highly purified population of gonadotrophs. *Ann Endocrinol (Paris)* **42**, 65-79.

Denef C, Baes M, Schramme C (1984) Stimulation of prolactin secretion after short term or pulsatile exposure to dopamine in superfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology* **114**, 1371-1378.

Denef C, Baes M, Schramme C (1986) Paracrine interactions in the anterior pituitary : Role in the regulation of prolactin and growth hormone secretion. In : *Frontiers in neuroendocrinology Vol 9*, edited by Ganong WF and Martini JL, *Raven Press*, 115-134.

Dhariwal APS, Grosvenor CE, Antunes-Rodrigues J, McCann SM (1968) Studies on the purification of bovine prolactin-inhibiting factor. *Endocrinology* **82**, 1236-1243.

Drouin J, Léan AD, Rainville D, Lachance R, Labrie F (1976) Characteristics of the interaction between thyrotropin-releasing hormone and somatostatin for thyrotropin and prolactin release. *Endocrinology* **98**, 514-521.

Drummond AH, Bushfield M, MacPhee CH (1984) TRH stimulated ³H-inositol metabolism in GH₃ pituitary tumor cells. *Mol Pharmacol* **25**, 201-208.

Enjalbert A, Ruberg M, Arancibia S, Priam M, Kordon C (1979) Endogenous opiates block dopamine inhibition of prolactin secretion in vitro. *Nature* **280**, 595-597.

Enjalbert A, Arancibia S, Ruberg M, Priam M, Bluet-Pajot MT, Rotsztejn WH, Kordon C (1980) Stimulation of in vitro prolactin release by VIP. *Neuroendocrinology* **31**, 200-204.

Enjalbert A, Arancibia S, Priam M, Bluet-Pajot MT, Kordon C (1982) Neurotensin stimulation of prolactin secretion in vitro. *Neuroendocrinology* **34**, 95-98.

Enjalbert A, Sladeczek F, Guillon G, Bertrand P, Shu C, Epelbaum J, Garcia-Scunz A, Jard S, Lombard C, Kordon C, Bockaert J (1986) Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate production in anterior pituitary cells. Involvement in prolactin secretion. *J Biol Chem* **261**, 4071-4075.

Everett JW (1954) Luteotrophic function of autografts of the rat hypophysis. *Endocrinology* **54**, 685-689.

Farkouh NH, Packer MG, Frantz AG (1979) Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum : high proportion in basal state and reduction after thyrotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **48**, 1026-1030.

Farquhar MG, Skutelsky EH, Hopkins CR (1975) Structure and function of the anterior pituitary and dispersed pituitary cells : In vitro studies. In: *The Anterior Pituitary*, edited by Tixier-Vidal A and Farquhar MG, *Academie Press New-York*, 84-98.

Fink G, Koch Y, Ben Aroya N (1982) Release of thyrotropin releasing hormones into hypophysial portal blood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion. *Brain Res* **243**, 186-189.

Fowler VM, Pollard HB (1982) Chromaffin granule membrane-actin interactions are calcium sensitive. *Nature* **295**, 336-339.

Frawley LS, Boockfor FR, Hoeffler JP (1985) Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. *Endocrinology* **116**, 734-737.

Friesen H, Guyda H, Hardy J (1970) Biosynthesis of human growth hormone and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* **31**, 611-631.

Fukami K, Endo T, Imamura M, Takenawa J (1984) Alpha-actinin and vinculin are PIP₂-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J Biol Chem* **269**, 1518-1522.

Gadbois DM, Crissman HA, Tobey RA, Bradbury EM (1992) Multiple kinase arrest points in the G₁ phase of nontransformed mammalian cells are absent in transformed cells. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 8626-8630.

Gala RR, Hart IC (1980) Serum prolactin heterogeneity in the cow and goat. *Life Sci* **27**, 723-730.

Gala RR (1991) Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* **198**, 513-527.

- Gale CC, Taleisnik S, Friedman HM, McCann SM** (1961) Hormonal basis for impairments in milk synthesis and milk ejection following hypothalamic lesions. *J Endocrinol* **23**, 303-314.
- Geiger B, Volk T, Bendori R** (1987) Molecular interactions in adherens-type contacts. *J Cell Sci (suppl.)* **8**, 261-272.
- Giannattasio G, DeFerrari ME, Spada A** (1981) Dopamine-inhibited adenylate cyclase in female rat adenohypophysis. *Life Sci* **28**, 1605-1612.
- Goldman RD, Knipe DW** (1973) Functions of cytoplasmic fibers in nonmuscle cell motility. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **37**, 523-534.
- Golander A, Hurley T, Barret J, Hizzi A, Handwerger S** (1978) Prolactin synthesis by human chorion-decidual tissue : a possible source of amniotic fluid prolactin. *Science* **202**, 311-313.
- Grandison L, Guidotti A** (1977) Regulation of prolactin release by endogenous opiates. *Nature* **270**, 357-359.
- Grandison L, Guidotti A** (1979) γ -Aminobutyric acid receptor function in rat anterior pituitary : Evidence for control of prolactin release. *Endocrinology* **105**, 754-759.
- Grosvenor CE, Whitworth NS** (1983) Accumulation of prolactin by maternal milk and its transfer to circulation of neonatal rat. *Endocrinol Exp* **17**, 271-281.
- Grosvenor CE, Picciano MF, Baumrucker CR** (1992) Hormones and growth factors in milk. *Endocr Rev* **14**, 710-728.

Gundersen D, Orlowski J, Rodriguez-Boulan E (1991) Apical polarity of Na, K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *JCell Biol* **112**, 863-872.

Hagen TC, Arnaout MA, Scherzer WJ, Martinson DR, Garthwaite TL (1986) Antisera to vasoactive intestinal polypeptide inhibit basal prolactin release from dispersed anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* **43**, 641-645.

Hall A (1994) Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 31-54.

Hall MK, MacLeod RM, Orcutt P (1976) Dibutyryl cyclic AMP, adenosine and guanosine blockade of the dopamine, ergocryptine and apomorphine inhibition of prolactin release in vitro. *Endocrinology* **99**, 1612-1617.

Halmi NS (1982) Occurrence of both growth hormone and prolactin immunoreactive material in the cells of human somatotrophic pituitary adenomas containing mammatropic elements. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol* **398**, 19-31.

Handwerger S, Richards RG, Markoff E (1990) The physiology of decidual prolactin and other decidual protein hormones. *Trends Endocrinol Metab* **3**, 91-95.

Hanew K, Rennels EG (1982) Effects of culture age on PRL and GH responses to bromocriptine and somatostatin from pituitary cultures of rat anterior pituitary cells, *Proc Soc Exp Biol Med* **171**, 112-118.

Harper ME, Sibley PEC, Pieling WB, Griffiths K (1981) The prostatic cell : Structure and function , edited by Alan R. *Liss Inc.*, p 115-218.

Hassoun J, Jaquet P, Devictor B, Andonian C, Grisoli F, Gunz G, Toga M (1985) Bromocriptine effects on cultured human prolactin-producing pituitary adenomas. In vitro ultrastructural, morphometric, and immunoelectron microscopic studies. *J Clin endocrinol Metab* **61**, 686-692.

Hecht G, Pestic L, Nikcevic G, Koutsouris A, Tripuranemi J, Lorimier DD, Nowak G, Guerriero V Jr, Elson EL, de Lanerolle P (1996) Expression of the catalytic domain of myosin light chain kinase increases paracellular permeability. *Am J Physiol* **271**, C1678-C1684.

Hokfelt T, Fahrenkrug J, Tatemoto K, Mutt V, Werner S, Hulting AL, Terenius L, Chang KJ (1983) The PHI (PHI-27) corticotropin releasing factor enkephalin immunoreactive neuron : Possible morphological basis for integrated control of prolactin, corticotropin and growth hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 895-899.

Horvath E, Kovacs K, Killinger DW, Smyth HS, Weiss MH, Ezrin C (1983) Mammosomatotroph cell adenoma of the human pituitary : a morphologic entity. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol* **398**, 277-288.

Inenaga K, Mason WT (1987) Chloride channels activated by gamma-aminobutyric acid in normal bovine lactotrophs. *Brain Res* **405**, 159-164.

Inenaga K, Mason WT (1987) Gamma-aminobutyric acid modulates chloride channel activity in cultured primary bovine lactotrophs. *Neuroscience* **23**, 649-660.

Ishibashi M, Yamaji T, Takaku F, Teramoto A, Fukushima T, Toyama M, Kamoi K (1987) Effect of GnRH-associated peptide on prolactin secretion from human lactotrope adenoma cells in culture. *Acta Endocrinol* **116**, 81-84.

Jarvis WD, Judd AM, MacLeod RM (1988) Attenuation of anterior pituitary phosphoinositide metabolism by the D2 dopamine receptor. *Endocrinology* **123**, 2793-2799.

Jones TH, Brown BL, Dobson PRM (1987) Bradykinin stimulates inositol phosphate production and prolactin release in rat anterior pituitary cells. Program of the 6th Joint Meeting of British Endocrine Societies. Warwick, England (abstract 155)

Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH (1984) Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech* **1**, 3-8.

Johnson LK, Baxter JD, Vlodaysky I, Gospodarowicz D (1980) Epidermal growth factor and expression of specific genes : Effects on cultured rat pituitary cells are dissociable from the mitogenic response. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 394-398.

Johnson RP, Graig SW (1995) F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and talin domains. *Nature* **373**, 261-264.

Judd AM, Jarvis WD, MacLeod RM (1987) Attenuation of pituitary polyphosphoinositide metabolism by protein kinase C activation. *Mol Cell Endocrinol* **54**, 107-114.

Judd AM, Koike K, Schettini G, Login IS, Hewlett EL, Yasumoto T, MacLeod RM (1985) Dopamine decreases 7315a tumor cell prolactin release induced by calcium mobilization. *Endocrinology* **117**, 1215-1221.

Judd AM, Login IS, Kovaks K, Ross PC, Spangelo BL, Jarvis WD, MacLeod RM (1988) Characterization of the MMQ cell, a prolactin-secreting clonal cell line that is responsive to dopamine. *Endocrinology* **123**: 2341-2350.

Kacsóh B, Toth BE, Avery LM, Yamamuro Y, Grosvenor CE (1991) Molecular heterogeneity of prolactin in lactating rats and their pups : biological and immunological activities in pituitary gland, serum and milk. *Endocr Regul* **25**, 98-110.

Kacsóh B, Veress Z, Toth BE, Avery LM, Grosvenor CE (1993) Bioactive and immunoreactive variants of PRL in milk and serum of lactating rats and their pups. *J Endocrinol* **138**, 243-257.

Kaibuchi K, Takai Y, Sawamura M, Hoshijima M, Fijikura T, Nishizuka Y (1983) Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *J Biol Chem* **258**, 6701-6704.

Karecla PI, Kreis TE (1992) Interaction of membranes of the Golgi complex with microtubules in vitro. *Eur J Cell Biol* **57**, 139-146.

Kato Y, Chihara K, Ohgo S, Iwasaki Y, Abe H, Imura H (1976) Growth hormone and prolactin release by substance P in rats. *Life Sci* **19**, 441-446.

Kelly E, Batty I, Nahorski SR (1988) Dopamine receptor stimulation does not affect phosphoinositide hydrolysis in slices of rat striatum. *J Neurochem* **51**, 919-924.

Khoram O, McCann SM (1986) On the presence of a dopaminergic, peptidergic prolactin release-inhibiting factor in hypothalamic extracts of infantile rats. *Neuroendocrinology* **44**, 65-69.

Kikkawa U, Takai Y, Minakuchi R, Inohara S, Nishizuka Y (1982) Calcium-activated, phospholipid-dependant protein kinase from rat brain : subcellular distribution, purification, and properties. *J Biol Chem* **257**, 13341-13348.

Kimura N, Hayafuji C, Konagaya H, Takahashi K (1986) 17β -Estradiol induces somatostatin (SRIF) inhibition of prolactin release and regulates SRIF receptors in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **119**, 1028-1036.

Koike K, Judd AM, Login IS, Yasumoto T, MacLeod RM (1986) Maitotoxin, a calcium channel activator, increases prolactin release from rat pituitary tumor 7315a cells by a mechanism that may involve leukotriene production. *Neuroendocrinology* **43**, 283-290.

Koldowski MD (1980) Hormones in milk. *Life Sci* **26**, 1833-1836.

Kolesnick RN, Gershengorn MC (1984) Ca^{2+} ionophores affect phosphoinositide metabolism differently than thyrotropin-releasing hormone in GH₃ pituitary cells. *J Biol Chem* **259**, 9514-9519.

Kuhn E, Krulich L, Fawcett CP, McCann SM (1974) The ability of hypothalamic extracts to lower blood prolactin levels in lactating rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **146**, 104-109.

Kuriakose NR, Reifel CW, Bendayan M, Elce JS, Shin SH (1989) Prolactin crinophagy is induced in the estrogen-stimulated male rat pituitary. *Histochemistry* **92**, 499-503.

Lafond J, Ducharme JR, Collu R (1986) Inhibition of prolactin release and blockade of adenohipophyseal cell cyclic AMP accumulation are two dissociable effects of dopaminergic and non-dopaminergic drugs. *Mol Cell Endocrinol* **44**, 219-224.

Lamberts SWJ, MacLeod RM (1978) Studies on the mechanism of the GABA-mediated inhibition of prolactin secretion. *Proc Soc Exp Biol Med* **158**, 10-13.

Lamberts SWJ, Klijn JGM, Van Vroonhoven CCJ, Stefanko SZ (1985) Different responses of growth hormone secretion to guanfacine, bromocriptine, and thyrotropin-releasing hormone in acromegalic patients with pure growth hormone (GH)-containing and mixed GH/prolactin-containing pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **60**, 1148-1153.

Lamberts SWJ, Zuyderwijk J, Den Holder F, Van Koetsveld P, Hofland LJ (1989) Studies on the conditions of the effects of somatostatin on adrenocorticotropin, prolactin and thyrotropin release by cultured rat pituitary cells. *Neuroendocrinology* **50**, 44-50.

Lamberts SWJ, MacLeod RM (1990) Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Rev* **70**, 279-318.

Landolt AM, Osterwalder V, Landolt TA (1985) Bromocriptine-induced removal of endoplasmic membranes from prolactinoma cells. *Experientia* **41**, 640-642.

Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC (1996) Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* **271**, 981-983.

Lawson DM, Gala RR, Chin M, Hainslender DH (1980) Size heterogeneity of plasma prolactin in the rat : TRH and serotonin-induced changes. *Life Sci* **27**, 1147-1151.

Le Roith D, Shiloach J, Berelowitz M, Frohman LA, Liotta LS, Krieger DT, Roth J (1983) Are messenger molecules in microbes the ancestors of the vertebrate hormones and tissue factors ? *Federation Proc* **42**, 2602-2607.

Lee RWH, Trifaró JM (1981) Characterization of anti-actin antibodies and their use in immunocytochemical studies on the localization of actin in adrenal chromaffin cells. *Neuroscience* **6**, 2087-2108.

Lelkes PI, Friedman JE, Rosenhek K, Oplatka A (1986) Destabilization of actin filaments as a requirements for the secretion of catecholamines from permeabilized chromaffin cells. *FEBS Lett* **208**, 357-363.

Leong DA, Lau SK, Sinha YN, Kaiser DL, Thorner MO (1985) Enumeration of lactotropes and somatotropes among male and female pituitary cells in culture : evidence in favor of a mammosomatotrope subpopulation in the rat. *Endocrinology* **116**, 1371-1378.

Leung FC, Russell SM, Nicoll CS (1978) Relationship between bioassay and radioimmunoassay estimates of prolactin in the rat serum. *Endocrinology* **103**, 1619-1628.

Lien EI, Fenichel RI, Garsky V, Sarantakis D, Grant NH (1976) Enkephalin-stimulated prolactin release. *Life Sci* **19**, 837-840.

Lledo PM, Guerineau N, Mollard P, Vincent JD, Israel JM (1990) Physiological characterization of two functional states in subpopulations of prolactin cells from lactating rats. *J Physiol* **437**, 447-494.

Lloyd RV, Mailloux J (1988) Analysis of S-100 protein positive folliculo-stellate cells in rat pituitary tissues. *Am J Pathology* **133**, 338-346.

Loeffler JP, Kley N, Pittius CW, Almeida OF, Holt V (1986) In vivo and in vitro studies of GABAergic inhibition of prolactin biosynthesis. *Neuroendocrinology* **43**, 504-510.

Login IS, Judd AM, Cronin MJ, Yasumoto T, MacLeod RM (1985) Reserpine is a calcium channel antagonist in normal end GH3 rat pituitary cells. *Am J Physiol* **248**, E15-E19.

Luna EJ, Hitt AL, (1985) Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* **258**, 955-964.

Lunkin PM (1960) Action of hypophysectomy on antibody formation in the rat. *Acta Pathol Microbiol Scand* **48**, 351-355.

Luque EH, Munoz de Toro M, Smith PF, Neill JD (1986) Subpopulations of lactotropes detected with the reverse hemolytic plaque assay show differential responsiveness to dopamine. *Endocrinology* **118**, 2120-2124.

Machesky LM, Hall A (1996) Rho : a connection between membrane receptor signaling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **6**, 304-310.

Kurihara H, Uchida K (1987) Distribution of microfilaments in exocrine (ventral prostatic epithelial cells and pancreatic cells) and endocrine cells (cells of the adenohypophysis and islets of Langerhans). The relationship between cytoskeleton and epithelial cell polarity. *Histochemistry* **87**, 223-227.

Lafond J, Ducharme JR, Collu R (1986) Inhibition of prolactin release and blockade of adenohypophyseal cell cyclic AMP accumulation are two dissociable effects of dopaminergic and non-dopaminergic drugs. *Mol Cell Endocrinol* **44**, 219-224.

Lamberts SWJ, MacLeod RM (1978) Studies on the mechanism of the GABA-mediated inhibition of prolactin secretion. *Proc Soc Exp Biol Med* **158**, 10-13.

Lamberts SWJ, Klijn JGM, Van Vroonhoven CCJ, Stefanko SZ (1985) Different responses of growth hormone secretion to guanfacine, bromocriptine, and thyrotropin-releasing hormone in acromegalic patients with pure growth hormone (GH)-containing and mixed GH/prolactin-containing pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **60**, 1148-1153.

Lamberts SWJ, Zuyderwijk J, Den Holder F, Van Koetsveld P, Hofland LJ (1989) Studies on the conditions of the effects of somatostatin on adrenocorticotropin, prolactin and thyrotropin release by cultured rat pituitary cells. *Neuroendocrinology* **50**, 44-50.

Lamberts SWJ, MacLeod RM (1990) Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Rev* **70**, 279-318.

Landolt AM, Osterwalder V, Landolt TA (1985) Bromocriptine-induced removal of endoplasmic membranes from prolactinoma cells. *Experientia* **41**, 640-642.

Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC (1996) Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* **271**, 981-983.

Lawson DM, Gala RR, Chin M, Hainslender DH (1980) Size heterogeneity of plasma prolactin in the rat : TRH and serotonin-induced changes. *Life Sci* **27**, 1147-1151.

Le Roith D, Shiloach J, Berelowitz M, Frohman LA, Liotta LS, Krieger DT, Roth J (1983) Are messenger molecules in microbes the ancestors of the vertebrate hormones and tissue factors ? *Federation Proc* **42**, 2602-2607.

Lee RWH, Trifaró JM (1981) Characterization of anti-actin antibodies and their use in immunocytochemical studies on the localization of actin in adrenal chromaffin cells. *Neuroscience* **6**, 2087-2108.

Lelkes PI, Friedman JE, Rosenhek K, Oplatka A (1986) Destabilization of actin filaments as a requirements for the secretion of catecholamines from permeabilized chromaffin cells. *FEBS Lett* **208**, 357-363.

Leong DA, Lau SK, Sinha YN, Kaiser DL, Thorner MO (1985) Enumeration of lactotropes and somatotropes among male and female pituitary cells in culture : evidence in favor of a mammosomatotrope subpopulation in the rat. *Endocrinology* **116**, 1371-1378.

Leung FC, Russell SM, Nicoll CS (1978) Relationship between bioassay and radioimmunoassay estimates of prolactin in the rat serum. *Endocrinology* **103**, 1619-1628.

Lien EI, Fenichel RI, Garsky V, Sarantakis D, Grant NH (1976) Enkephalin-stimulated prolactin release. *Life Sci* **19**, 837-840.

Lledo PM, Guerineau N, Mollard P, Vincent JD, Israel JM (1990) Physiological characterization of two functional states in subpopulations of prolactin cells from lactating rats. *J Physiol* **437**, 447-494.

Lloyd RV, Mailloux J (1988) Analysis of S-100 protein positive folliculo-stellate cells in rat pituitary tissues. *Am J Pathology* **133**, 338-346.

Loeffler JP, Kley N, Pittius CW, Almeida OF, Holt V (1986) In vivo and in vitro studies of GABAergic inhibition of prolactin biosynthesis. *Neuroendocrinology* **43**, 504-510.

Login IS, Judd AM, Cronin MJ, Yasumoto T, MacLeod RM (1985) Reserpine is a calcium channel antagonist in normal end GH3 rat pituitary cells. *Am J Physiol* **248**, E15-E19.

Luna EJ, Hitt AL, (1985) Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* **258**, 955-964.

Lunkin PM (1960) Action of hypophysectomy on antibody formation in the rat. *Acta Pathol Microbiol Scand* **48**, 351-355.

Luque EH, Munoz de Toro M, Smith PF, Neill JD (1986) Subpopulations of lactotropes detected with the reverse hemolytic plaque assay show differential responsiveness to dopamine. *Endocrinology* **118**, 2120-2124.

Machesky LM, Hall A (1996) Rho : a connection between membrane receptor signaling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **6**, 304-310.

MacLeod RM, Lehmyer JE, Bruni C (1973) Effect of anti-mitotic drugs on the in vitro secretory activity of mammothrophs and somatotrophs and their microtubules. *Proc Soc Exp Biol Med* **144**, 259-267.

MacLeod RM (1976) Regulation of prolactin secretion. *Front Neuroendocrinology* **4**, 169-194.

Markoff E, Lee DW (1987) Glycosylated prolactin is a major circulating variant in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* **65**, 1102-1106.

Markoff E, Lee DW, Hollingsworth DR (1988) Glycosylated and nonglycosylated prolactin in serum during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* **67**, 519-523.

Martin TF (1983) Evidence for the role of a phosphoinositide specific phospholipase in hormone action. *J Biol Chem* **258**, 14816-14822.

Martin TF (1985) Dual intracellular signaling by Ca^{+2} and lipids mediates the actions of TRH. In : Prolactin : Basic and Clinical Correlates, edited by MacLeod RM, Thorner MO, and Scapagnini U. *Liviana Press*, 195-203.

Martin MC, Weiner RI, Monroe SE, Roberts JM, Licko V, Jaffe RB (1984) Prolactin-secreting adenomas in women. VII. Dopamine regulation of prolactin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **59**, 485-490.

Martinez de la Escalera G, Guthrie J, Weiner RI (1988) Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by TRH but not VIP : stimulation via Ca^{2+} /protein kinase C pathway. *Neuroendocrinology* **47**, 38-45.

Martinez de la Escalera G, Weiner RI (1992) Dissociation of dopamine from its receptor as a signal in the pleiotropic hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocr Rev* **13**, 241-255.

Martinez de la Escalera G, Weiner RI (1992) Hypothalamic regulation of microtubule-associated protein phosphorylation in lactotrophs. *Neuroendocrinology* **55**, 327-335.

Masler IA, Riddick DH (1979) Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* **135**, 751-754.

Matsumoto M, Hidaka K, Tada S, Tasaki Y, Yamaguchi T (1995) Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. *Mol Brain Res* **29**, 157-162.

Matsuno A, Takekoshi S, Sanno N, Utsunomiya H, Ohsugi Y, Saito N, Kanemitsu H, Tamura A, Nagashima T, Osamura RY, Watanabe K (1997) Modulation of protein kinases and microtubule-associated protein and changes in ultrastructure in female rat pituitary cells : Effects of estrogen and bromocriptine. *J Histochemical Soc* **45**, 805-813.

Matsushita N, Kato Y, Shimatsu A, Katakami H, Fugino M, Matsuo H, Imura H (1982) Stimulation of prolactin secretion in the rat by α -neo-endorphin, β -neo-endorphin and dynorphin. *Biochem Biophys Res Commun* **107**, 735-741.

McCann SM, Lumpkin MD, Mizunuma H, Khorram O, Ottlecz A, Samson WK (1984) Peptidergic and dopaminergic control of prolactin release. *Trends Neurosci* **7**, 127-131.

Mena F, Pacheco P, Grosvenor CE (1980) Effect of electrical stimulation of mammary nerve upon pituitary and plasma concentrations of prolactin in anesthetized lactating rats. *Endocrinology* **106**, 458-462.

Menkel AR, Kroemker M, Bubeck P, Ronsiek M, Nikolai G, Jockusch BM (1994) Characterization of an F-actin-binding domain in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Biol* **126**, 1231-1240.

Meuris S, Verloes A, Robyn C (1983) Immunocytochemical localization of prolactin-like immunoreactivity in rat pancreatic islets. *Endocrinology* **112**, 2221-2223.

Millar RP, Wormald PJ, Milton RCL (1986) Stimulation of gonadotropin release by a non-GnRH peptide sequence of the GnRH precursor. *Science Wash DC* **232**, 68-70.

Mizunuma H, Khorram O, McCann SM (1985) Purification of a non-dopaminergic and non-gabaergic prolactin release-inhibiting factor (PIF) in sheep stalk-median eminence. *Proc Soc Exp Biol Med* **178**, 114-119.

Morel G, Besson J, Rosselin G, Dubois PM (1982) Ultrastructural evidence for endogenous vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in the pituitary gland. *Neuroendocrinology* **34**, 85-89.

Muallem S, Kwiatkowska K, Yin HL (1995) Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol* **128**, 589-598.

Muller L, Picart R, Barret A, Bockaert J, Homburger V, Tougard C (1994) Identification of multiple subunits of heterotrimeric G proteins on the membrane of secretory granules in rat prolactin anterior pituitary cells. *Mol Cell Neurosc* **5**, 556-566.

Nagy G, Mulchahey JJ, Neill JD (1988) Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* **122**, 364-366.

Nakata T, Hirokawa N (1992) Organization of cortical cytoskeleton in cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching and double labeling immunoelectron microscopy. *J Neurosci* **12**, 2186-2197.

Neill JD (1970) Effect of stress on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* **87**, 1192-1197.

Neill JD (1974) Prolactin : its secretion and control. In : Handbook of Physiology, section 7 : Endocrinology , Volume 4, edited by Knobil E and Sawyer WH. *American Physiology Society*, 469-488.

Neill JD, Smith PF, Luque EH, Munoz de Toro M, Nagy G, Mulchahey J (1987) Detection and measurement of hormone secretion from individual pituitary cells. *Recent Prog Horm Res* **43**, 175-229.

Nicosia S, Spada A, Gianattasiaw G (1982) Effects of vasoactive intestinal polypeptide on the pituitary gland. In : Vasoactive Intestinal Peptide, edited by Said SI. *Raven Press*, 263-275.

Niggli V, Burger MM (1987) Interaction of the cytoskeleton with the plasma membrane. *J Membrane Biol* **100**, 97-121.

Nogami H, Yoshimura F (1982) Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anat Rec* **204**, 255-263.

Nolin JM, Witorsch RJ (1976) Detection of endogenous immunoreactive prolactin in rat mammary epithelial cells during lactation. *Endocrinology* **99**, 949-958.

Nolin JM (1978) Intracellular prolactin in rat corpus luteum and adrenal cortex. *Endocrinology* **102**, 402-406.

Nowark RA, Rein MS, Heffner LJ, Friedman AJ, Tashjian Jr AH (1993) Production of prolactin by smooth muscle cells cultured from human uterine fibroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **76**, 1308-1313.

Nuckolls GH, Romer LH, BurrIDGE K (1992) Microinjection of antibodies against talin inhibits the spreading and migration of fibroblasts. *J Cell Sci* **102**, 753-762.

Ondo JG, Dom R (1986) The arcuate nucleus : a site for gamma-aminobutyric acid regulation of prolactin secretion. *Brain Res* **381**, 43-48.

Orci L, Gabby KH, Malaisse WJ (1972) Pancreatic beta-cell web, its possible role in insulin secretion. *Science* **175**, 1128-1130.

Otto JJ (1990) Vinculin. *Cell Motil cytoskeleton* **16**, 1-6.

Palade GE (1975) Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* **189**, 347-358.

Papka RE, Yu SM, Nikitovitch-Winer MB (1986) Use of immunoperoxidase and immunogold labelling for pituitary hormones and neuropeptides. *Am J Anat* **175**, 289-294.

Parry DM, McMillen IC, Robinson JS, Thorburn GD (1979) Immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the perinatal sheep pituitary. *Cell Tissue Res* **1197**, 501-514.

Paschal BM, Shpetner HS, Vallee RB (1987) MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J Cell Biol* **105**, 1273-1282.

Pass KA, Ondo JA (1977) The effect of gamma-aminobutyric acid on prolactin and gonadotropin secretion in the unanesthetized rat. *Endocrinology* **100**, 1437-1442.

Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A (1990) Microinjection of recombinant p21^{rho} induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol* **111**, 1001-1007.

Perrin D, Aunis D (1985) Reorganization of α -fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature* **315**, 589-591.

Pizzi M, Da Prada M, Valerio A, Memo M, Spano PF, Haefly WE (1988) Dopamine D2 receptor stimulation inhibits inositol phosphate generating system in rat striatal slices. *Brain Res* **456**, 235-240.

Plotsky PM, Neill JD (1982) Interactions of dopamine and thyrotropin-releasing hormone in the regulation of prolactin release in lactating rats. *Endocrinology* **111**, 168-173.

Podlubnaya ZA, Tskhivrebova LA, Zaalishvili MM, Stefanenko GA (1975) Electron microscopic study of α -actinin. *J Mol Biol* **92**: 357-359.

Polard TD (1981) Purification of a calcium-sensitive actin gelation protein from *Acanthamoeba*. *J Biol Chem* **256**, 7666-7670.

Pryor-Jones RA, Silverlight JJ, Jenkins JS (1987) VIP Increases intracellular free calcium in rat and human pituitary tumour cells *in vitro*. *J Endocrinol* **114**, 119-125.

Racagni G, Apud JA, Locatelli V, Cocchi D, Nistico G, Di Giorgio RM, Muller EE (1979) Gaba of CNS origin in the rat anterior pituitary inhibits prolactin secretion. *Nature Lond* **281**, 575-578.

Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA (1988) Glycobiology. *Ann Rev Biochem* **57**, 785-838.

Ravindra R, Grosvenor CE (1990) Involvement of cytoskeleton in polypeptide hormone secretion from the anterior pituitary lobe : a review. *Mol Cell Endocrinology* **71**, 165-176.

Ray KP, Wallis M (1982) Involvement of calcium ions in dopamine inhibition of prolactin secretion from sheep pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* **28**, 691-703.

Rebecchi MJ, Kolesnick RN, Gershengorn MC (1983) TRH stimulates rapid loss of phosphatidylinositol and its conversion to 1,2 diacylglycerol and phosphatidic acid in rat mammatropic pituitary cells. *J Biol Chem* **258**, 227-234.

Rengachary SS, Tomita T, Jefferies BF, Watanabe I (1982) Structural changes in human pituitary tumor after bromocriptine therapy. *Neurosurgery* **10**, 242-251.

Ridley AJ, Comoglio PM, Hall A (1995). Regulation of scatter factor / hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol Cell Biol* **15**, 1110-1122.

Robberecht P, Deschodt-Lanckman M, Camus JC, DeNeef P, Lambert M, Christophe J (1979) VIP activation of rat anterior pituitary adenylate cyclase. *FEBS Lett* **103**, 229-231.

Roomer LH, McLean N, Turner CE, Burrige K (1994) Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization, and motility in human vascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* **5**, 349-361.

Ruberg M, Rotsztejn WH, Arancibia S, Besson J, Enjalbert A (1978) Stimulation of prolactin release by vasoactive intestinal peptide (VIP). *Eur J Pharmacol* **51**, 319-320.

Said SI, Porter JC (1979) Vasoactive intestinal polypeptide : release into hypophysial portal blood. *Life Sci* **24**, 227.

Salas PJI, Rodriguez ML, Viciano AL, Vega-Salas DE, Hauri HP (1997) The apical submembrane cytoskeleton participates in the organization of the apical pole in the epithelial cells. *J Cell Biol* **137**, 359-375.

Sato S (1980) Postnatal development, sexual difference and sexual cycle variation of prolactin cells in rats : Special reference to the topographic affinity to a gonadotroph. *Endocrinol Jpn* **27**, 573-583.

Sato M, Schwartz WH, Pollard TD (1987) Dependence of the mechanical properties of actin/alpha-actinin in gels on deformation rate. *Nature* **325**, 828-830.

Schachter H (1984) Glycoproteins : their structure, biosynthesis and possible clinical implications. *Clin Biochem* **17**, 3-14.

Schäfer BW, Heizmann CW (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins : functions and pathology. *Trends Biochem* **21**, 134-140.

Schettini G, Cronin MJ, MacLeod RM (1983) Adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) and calcium-calmodulin inter-relation in the control of prolactin secretion: evidence for dopamine inhibition of cAMP accumulation and prolactin release after calcium mobilization. *Endocrinology* **112**, 1801-1807.

Schonbrunn A, Krasnoff M, Westendorf JM, Tashjian AH Jr (1980) Epidermal growth factor and thyrotropin-releasing hormone act similarly on a clonal pituitary cell strain : Modulation of hormone production and inhibition of cell proliferation. *J Cell Biol* **85**, 786-797.

Schramme C, Deneff C (1983) Stimulation of prolactin release by angiotensin II in superfused rat anterior pituitary aggregates. *Neuroendocrinology* **36**, 483-485.

Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981) Forskolin unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad sci* **78**, 3363-3367.

Sekine A, Fujiwara M, Narumiya S (1989) Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **264**, 8602-8605.

Serri O, Rasio E, Beauregard H, Hardy J, Somma M (1983) Recurrence of hyperprolactinoma after selective transsphenoidal adenomectomy in women with prolactinoma. *N Eng J Med* **309**, 280-284.

Shimatsu A, Kato Y, Matsushita N, Katakami H, Yanaihara N, Imura H (1981) Immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in rat hypophysial blood. *Endocrinology* **108**, 395-398.

Shin SH, Obensawin MC, Vincent S (1985) The major prolactin releasing activity from bovine posterior pituitary is identified as neurophysin II. In : Prolactin: Basic and Clinical Correlates, edited by MacLeod RM, Thorner MO and Scapagnini U. *Liviana Press*, 39-56.

Sinha YN (1995) Structural variants of prolactin : Occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* **16**, 354-369.

Slabaugh MB, Lieberman ME, Rutledge JJ, Gorski J (1982) Ontogeny of growth hormone and prolactin gene expression in mice. *Endocrinology* **110**, 1489-1497.

Smith PF, Luque EH, Neill JD (1986) Detection and measurement of secretion from neuroendocrine cells using a reverse hemolytic plaque assay. *Methods Enzymol* **124**, 443-465.

Sobrinho LG, Nunes MCP, Santos MA, Mauricio JC (1978) Radiological evidence for regression of prolactinoma after treatment with bromocriptine. *Lancet* **65**, 257-258.

Sporn MB, Todaro GJ (1980) Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* **303**, 878-880.

Spudich A, Meyer T, Stryer L (1992) Association of the beta isoform of protein kinase C with vimentin filaments. *Cell Motil & Cytoskeleton* **22**, 250-256.

Steele MK, Negro-Vilar A, McCann SM (1981) Effect of angiotensin II on in vivo and in vitro release of anterior pituitary hormones in the female rat. *Endocrinology* **109**, 893-900.

Stevens FM, Shaw C (1982) Prolactin-like immunoreactivity in human small intestine mucosa. *Br Med J* **284**, 1014-1015.

Stojilkovic SS, Isumi S, Catt KJ (1988) Participation of voltage sensitive calcium channels in pituitary hormone release. *J Biol Chem* **263**, 13054-13061.

Straub RE, Frech GC, Joho RH, Gershengorn MC (1990) Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 9514-9518.

Strutt DI, Weber U, Mlodzik M (1997) The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature* **387**, 292-295.

Sundberg DK, Krulich L, Fawcett CP, Illner P, McCann SM (1973) The effect of colchicine on the release of rat anterior pituitary hormones in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* **142**, 1097-1100.

Sutton CA, Martin TFJ (1982) TRH selectively and rapidly stimulates phosphatidylinositol turnover in GH pituitary cells : a possible second step of TRH action. *Endocrinology* **110**, 1273-1280.

Swearingen KC, Martinez de la Escalera G, Weiner RI (1990) Episodic prolactin release after removal of dopamine inhibition in vitro. *Bol Estud Med Biol* **38**, 43-48.

Swennen L, Deneff C (1982) Physiological concentrations of dopamine decrease cAMP levels in cultured rat anterior pituitary cells and enriched populations of lactotrophs : evidence for a causal relationship to inhibition of prolactin release. *Endocrinology* **111**, 398-405.

Takahara J, Arimura A, Schally AV (1974) Suppression of prolactin release by a purified porcine PIF preparation and catecholamines infused into a rat hypophysial portal vessel. *Endocrinology* **95**, 462-465.

Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakanishi H (1995) Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* **20**, 227-231.

Tam SW, Dannies PS (1981) The role of adenosine 3', 5'-monophosphate in dopaminergic inhibition of prolactin release in anterior pituitary cells. *Endocrinology* **109**, 403-408.

Taraskevich PS, Douglas WW (1978) Catecholamines of supposed inhibitory hypophysiotropic function suppress action potentials in prolactin cells. *Nature* **276**, 832-834.

Temple R, Williams JA, Wilber JF, Wolff J (1972) Colchicine and hormone secretion. *Biochem Biophys Res Commun* **46**, 1454-1461.

Thorner MO, Martin WH, Rogol AD, Morris JL, Perryman RL, Conway BP, Howard SS, Wolfman MG, MacLeod RM (1980) Rapid regression of pituitary prolactinomas during bromocriptine treatment. *J Clin Endocrinol Metab* **51**, 438-445.

Thorner MO, Hackett JT, Murad F, MacLeod RM (1980) Calcium rather than cyclic AMP as the physiological intracellular regulator of prolactin release. *Neuroendocrinology* **31**, 390-402.

Tindall GT, Kovacs K, Horvath E, Thorner MO (1982) Human prolactin-producing adenomas and bromocriptine : a histological, immunocytochemical, ultrastructural, and morphometric study. *J Clin endocrinol Metab* **55**, 1178-1183.

Tojo K, Kato Y, Ohto H, Shimatsu A, Matsushita N, Kabayama Y, Inoue T, Yanaihara N, Imura H (1985) Potent stimulatory effect of leuromorphin on prolactin secretion from the pituitary in rat. In : Prolactin : Basic and Clinical Correlates, edited by MacLeod RM, Thorner MO, and Scapagnini U. *Liviana Press*, 552-576.

Trifaró J-M, Kenigsberg RL, Côté A, Lee RWH, Hikita T (1984) Adrenal paraneurone contractile proteins and stimulus-secretion coupling. *Can J Physiol Pharmacol* **62**, 493-501.

Trifaró J-M, Novas ML, Fournier S, Rodriguez del Castillo A (1989) Cellular and molecular mechanisms in hormone and neurotransmitter secretion. In : Velazco M, Israel A, Romero E, Silva H (eds) Recent Advances in Pharmacology and Therapeutics. *Elsevier Science Publishing*, 5-19.

Trifaró J-M, Vitale ML (1993) Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci* **16**, 466-472.

Tsubura A, Mori S, Mori T, Nagasawa H (1986) Immunoreactive prolactin in mouse urethral glands. *Acta Anat (Basel)* **126**, 263-265.

Turner Ce, Glenney JR, Burridge JR (1990) Paxillin : a new vinculin-binding protein present in focal adhesion. *J Cell Biol* **111**, 1059-1068.

Vale R (1987) Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annu Rev Cell Biol* **3**, 347-378.

Valerio A, Alberici A, Tinti C, Spano P, Memo M (1994) Antisense strategy unravels a dopamine receptor distinct from D2 type, uncoupled with adenylyl cyclase, inhibiting prolactin release from rat pituitary cells. *J Neurochem* **62**, 1260-1266.

Vallar L, Vicentini LM, Mendolesi J (1988) Inhibition of inositol phosphate production is a late, Ca²⁺-dependant effect of D2 dopaminergic receptor activation in rat lactotroph cells. *J Biol Chem* **263**, 10127-10134.

Vijayan E, McCann SM (1979) In vivo and in vitro effects of substance P and neurotensin on gonadotropin and prolactin release. *Endocrinology* **105**, 64-68.

Vitale ML, Rodriguez del Castillo A, Tchakarov L, Trifaró JM (1991) Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *J Cell Biol* **113**, 1057-1067.

Vitale ML, Seward EP, Trifaró JM (1995) Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* **14**, 353-363.

Velkeniers B, Hooghe-Peters EL, Hooghe R, Belayew A, Smets G, Claeys A, Robberecht P, Vanhaelst L (1998) Prolactin cell subpopulations separated on discontinuous percoll gradient : an immunocytochemical, biochemical, and physiological characterization. *Endocrinology* **123**, 1619-1630.

Volberg T, Geiger B, Kam Z, Pankov R, Simcha I, Sabanay H, Coll LJ, Adamson ED, Benze'ev A (1995) Focal adhesion formation by F9 embryonal carcinoma cells after vinculin gene disruption. *J Cell Sci* **108**, 2253-2260.

Wachsstock DH, Wilkins JA, Lins S (1987) Specific interaction of vinculin with alpha-actinin. *Biochem Biophys Res Comm* **146**, 554-560.

Walters CA, Daly DC, Chapitis J, Kuslis ST, Prior JC, Kusmik WF, Riddick DH (1983) Human myometrium : a new potential source of prolactin. *Am J Obstet Gynecol* **147**, 639-644.

Wang SM, Tsai YJ, Jiang MJ, Tseng YZ (1997) Studies on the function of Rho A protein in cardiac myofibrillogenesis. *J Cell Biochem* **66**, 43-53.

Warchol JB, Herbert DC, Williams MG, Rennels EG (1975) Distribution of microtubules in prolactin cells of lactating rats. *Cell tissue Res* **159**, 205-212.

Watanabe YG, Daikoku S (1979) An immunocytochemical study on the cytogenesis of adenohypophysial cells in fetal rats. *Dev Biol* **68**, 557-573.

Welch WJ, Suhan JP (1985) Morphological study of the mammalian stress response : Characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J Cell Biol* **101**, 1198-1211.

Westendorf JM, Schonbrunn A (1982) Bombesin stimulates prolactin and growth hormone release by pituitary cells in culture. *Endocrinology* **110**, 352-358.

Wilson AK, Gorgas G, Claypool WD, de Lanerolle P (1991) An increase or a decrease in myosine II phosphorylation inhibits macrophage motility. *J Cell Biol* **114**, 277-283.

Wysolmerski RB, Lagunoff D (1991) Regulation of permeabilized endothelial cell retraction by myosin phosphorylation. *Biochemistry* **36**, 2063-2067.

Yamashiro D, Li CH (1973) Synthesis of a peptide with full somatostatine activity. *Biochem Biophys Res Comm* **54**, 882-888.

Yen SSC, Siler TM, De Vane GW (1974) Effet of somatostatin on patients with acromegaly suppression of growth hormone, prolactin, insulin and glucose levels. *N Engl J Med* **290**, 935-

REMERCIEMENTS

Je remercie ma directrice de recherche **Dr. Maria Leiza Vitale** pour son expertise, sa patience, sa disponibilité, son professionnalisme à mon égard tout au long de ma maîtrise.

Je remercie Dr R.M. Pelletier pour ses conseils précieux et son support technique. Malgré tout, j'ai beaucoup appris à vous cotoyer. Merci!

Merci à Eloisa Carbajal pour ses conseils techniques précieux et sa gentillesse. Merci pour tout ton aide! Et bonne chance dans la vie.

Merci à F. Dionne pour son assistance technique.

Mihcèle merci! Tu es merveilleuse!