

UNIVERSITE PAUL SABATIER
TOULOUSE.

Année Universitaire 1989-1990

THESE N° :

THESE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER
Sciences : Option Pharmacologie



par

Michel DELVAUX
Docteur en Médecine

Université Catholique de Louvain (Belgique).



**ANTIORT Na⁺/H⁺ DES CELLULES
ACINEUSES PANCREATIQUES :
REGULATION PAR LES PEPTIDES
NEURO-DIGESTIFS ET RÔLE DANS
LA PROLIFERATION CELLULAIRE.**

soutenu le 22 février 1990 devant la Commission d'Examen :

Président :	Mr Jean CROS	Professeur UPS
Examineurs :	MM André RIBET	Professeur UPS
	Patrick ROBBERECHT	Professeur ULB
	Christian FRELIN	DR CNRS
	Mme N. VAYSSE	DR INSERM

Groupe de Recherche de Biologie et Pathologie Digestive - INSERM U151
CHU de RANGUEIL, 31054 TOULOUSE.

SOMMAIRE.

PLAN.	1
ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION.	9
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	12
I. L'ECHANGE Na^+/H^+.	12
1. Caractérisation de l'échangeur	12
2. Mesure de l'activité d'échange Na^+/H^+ .	15
3. Mécanismes d'activation et régulation de l'activité	20
a. Activation par les facteurs internes et externes à la cellule.	
b. Les mécanismes intracellulaires.	
c. Activation au niveau moléculaire.	
4. Rôle physiologique	28
a. Maintien de l'homéostasie cellulaire	
b. Prolifération cellulaire.	
c. Hypertrophie cellulaire.	
d. Transports ioniques transépithéliaux.	
5. Relations avec quelques états pathologiques.	36
a. Equilibre acido-basique et Hypertension artérielle.	
b. Antiport Na^+/H^+ et cancer.	
c. Insuffisance respiratoire chronique.	
II. LES RECEPTEURS SPECIFIQUES DE LA CHOLECYSTOKININE ET DE LA GASTRINE.	41
1. Description des différentes classes de récepteurs CCK.	41
2. Utilisation des antagonistes spécifiques de la CCK et de la gastrine pour la caractérisation des récepteurs.	43
3. Récepteurs CCK-Gastrine et contrôle des fonctions pancréatiques.	46

MATERIEL ET METHODES.	48
I. Méthodes d'étude des acini isolés de cobaye.	48
A. Préparation des acini isolés.	48
1. Méthode de dispersion des acini de cobaye.	
2. Evaluation de la viabilité cellulaire.	
B. Etude de l'échange Na^+/H^+ des acini pancréatiques isolés de cobaye	50
1. Etude de la captation de Na radioactif par les acini isolés de cobaye (^{22}Na).	
2. Mesure du pH intracellulaire.	
C. Mesure de la sécrétion d'amylase par les acini isolés.	54
D. Etude de la liaison de la CCK aux acini pancréatiques.	56
II. Méthodes d'étude des cellules AR4-2J.	57
A. Conditions de culture.	57
B. Mesure de l'influx initial de ^{22}Na .	58
C. Incorporation de thymidine tritiée.	60
D. Mesure de la sécrétion et du contenu en amylase.	61
III. Liste des produits utilisés.	62
A. Peptides et hormones.	62
B. Antagonistes et réactifs divers.	62
C. Produits radioactifs.	63
D. Milieux de culture.	63

RESULTATS.

	64
I. Régulation de l'échange Na^+/H^+ des cellules acineuses pancréatiques.	64
A. Effet des peptides CCK-Gastrine.	64
1. Activation du captage de ^{22}Na amiloride-sensible par les peptides CCK-Gastrine.	
2. Corrélation entre l'effet des peptides CCK-Gastrine sur l'influx de Na et la sécrétion d'amylase.	
3. Inhibition de l'effet des peptides CCK-Gastrine par les antagonistes spécifiques.	
B. Effet d'autres peptides régulateurs.	75
C. Echange Na^+/H^+ et pH intracellulaire.	75
1. Influence de la concentration en Na^+ du milieu extracellulaire sur la régulation du pH_i .	
2. Effet des peptides CCK-Gastrine sur le pH_i .	
D. Messagers intracellulaires impliqués dans la stimulation de l'influx de Na^+ et la régulation du pH_i .	83
a. Messagers intracellulaires et influx de Na^+ .	83
1. Effet du Ca^{2+} et de l'ionophore A23187	
2. Effet du potentiel de membrane sur l'influx basal de Na^+ et la stimulation par la caeruleine.	
3. Effet des esters de phorbol et du diacylglycérol sur l'influx de Na^+	
4. Influence du TPA sur la stimulation de l'influx de Na^+ par la caeruleine.	
b. Messagers intracellulaires et variations du pH_i .	94

II. Rôle de l'échange Na^+/H^+ dans la prolifération d'une lignée de cellules acineuses pancréatiques de rat, la lignée AR4-2J.	97
A. Croissance des cellules AR4-2J : stimulation par différents facteurs.	98
B. Caractérisation de l'échange Na^+/H^+ des cellules AR4-2J.	98
1. Cinétique de l'influx de Na^+ amiloride-sensible.	
2. Influence de la concentration en Na^+ et du pH_e .	
3. Inhibition de l'influx de Na^+ par l'amiloride et ses analogues.	
C. Régulation de l'échange Na^+/H^+ des cellules AR4-2J par différents facteurs.	109
1. Stimulation par les agents mitogéniques.	
2. Stimulation par la bombésine et la carbamylcholine.	
3. Régulation par les peptides CCK-Gastrine.	
D. Implication de l'échange Na^+/H^+ dans la prolifération des cellules AR4-2J.	118
1. Stimulation de la prolifération cellulaire et de l'échange Na^+/H^+ par le sérum de veau fœtal.	
2. Effet de la concentration en Na du milieu de culture sur la prolifération des cellules AR4-2J.	
3. Effet de l'amiloride et de ses analogues sur la prolifération des cellules AR4-2J.	
4. Stimulation de la prolifération cellulaire et de l'échange Na^+/H^+ par la gastrine.	
E. Effet des analogues de l'amiloride sur le contenu cellulaire en amylase et la sécrétion d'amylase.	130

DISCUSSION DES RESULTATS.	132
I. Comparaison des caractéristiques de l'échange Na^+/H^+ des cellules acineuses pancréatiques de cobaye et des cellules AR4-2J.	132
II. Stimulation de l'échange Na^+/H^+ des cellules acineuses par les peptides CCK-Gastrine.	139
III. Les messagers intracellulaires impliqués dans la stimulation de l'échange Na^+/H^+ des cellules acineuses pancréatiques par les peptides CCK-Gastrine.	141
IV. Antiport Na^+/H^+ et contrôle de la prolifération.	147
V. Echange Na^+/H^+ et prolifération cellulaire : une relation univoque ?	152
CONCLUSIONS	158
BIBLIOGRAPHIE.	162
ANNEXE 1 : Liste des publications.	203

DELVAUX Michel : ANTIPORT Na⁺/H⁺ DES CELLULES ACINEUSES
PANCREATIQUES : REGULATION PAR LES PEPTIDES NEURO-
DIGESTIFS ET ROLE DANS LA PROLIFERATION CELLULAIRE.

Thèse pour le Doctorat en Sciences de l'Université Paul
Sabatier de Toulouse. Spécialité : Pharmacologie.

RESUME.

L'antiport Na⁺/H⁺ est un mécanisme de transport membranaire, ubiquitaire, échangeant un ion Na pour un proton. L'activation de cet échange par les peptides CCK et Gastrine conduit à une augmentation du pH intracellulaire. L'effet de la CCK est médié par le récepteur CCK et semble impliquer la stimulation de la kinase C au niveau intracellulaire. L'activation de l'antiport par la gastrine ne passe pas par le récepteur CCK.

L'antiport Na/H est également présent au niveau de la lignée cellulaire AR4-2J, dérivée d'un cancer pancréatique de rat et présente les mêmes caractéristiques pharmacologiques : dépendance vis-à-vis des concentrations externes en Na, inhibition par l'amiloride. L'activation de l'échange Na/H et la stimulation de la prolifération cellulaire par le sérum de veau foetal sont corrélées. L'amiloride et ses analogues inhibent échange Na/H et prolifération cellulaire aux mêmes concentrations, témoignant du rôle de l'antiport dans le contrôle des phénomènes prolifératifs au niveau de cette lignée cellulaire. Néanmoins, d'autres agents stimulants sont capables de stimuler l'échange Na/H sans être des facteurs de croissance, indiquant que d'autres processus métaboliques sont contrôlés par l'activation de l'antiport Na/H, notamment des phénomènes d'hypertrophie cellulaire.

MOTS CLES : Prolifération cellulaire - Antiport Na/H -
Hormones gastro-intestinales - Gastrine - CCK - Messagers
intracellulaires - Kinase C - Amiloride.

Thèse soutenue à Toulouse le 22 février 1990

Jury : Président : Pr. Jean CROS

Membres : Pr. André RIBET

Pr. Patrick ROBBERECHT

Dr. Christian FRELIN

Dr. Nicole VAYSSE