

Biochimie cellulaire

M. François GROS, professeur

Poursuivant l'étude du fonctionnement chimique des gènes, nous nous sommes intéressés cette année à la seconde étape du décodage de l'information chromosomique — étape généralement dénommée « traduction » — au cours de laquelle la séquence colinéaire des triplets de l'ARN messenger est transposée en un polymère tridimensionnel : la protéine. C'est donc sur les éléments de la machinerie cellulaire intervenant dans la biosynthèse des chaînes polypeptidiques, ainsi que sur la dynamique et la régulation de la protéosynthèse, que nous avons principalement fait porter notre attention.

Les principaux éléments de l'appareil traducteur

Deux composants de l'appareil « traducteur » jouent, par leur interaction avec le messenger, un rôle de premier plan dans le mécanisme du décodage des « triplets » : il s'agit des *ribosomes* et des *adapteurs*, ou ARN de transfert porteurs des acides aminés spécifiques. Des progrès considérables viennent d'être réalisés dans la chimie de structure des ribosomes ; non seulement on a pu dresser un inventaire physicochimique complet des protéines constitutives dont sont formées ces organelles, mais la séquence primaire de l'un des polyribonucléotides de constitution (ARN 16 S) est pratiquement élucidée. La conséquence la plus remarquable qui en découle est qu'il devient possible de préciser les domaines — ou portions de séquences — reconnus par les protéines de constitution de la petite sous-unité 30 S : certaines protéines (S_9 par exemple) n'interagissent qu'avec des zones relativement limitées de l'ARN 16 S, d'autres (S_4 , par exemple) admettent de nombreux points de contact avec le polynucléotide sur une distance relativement longue de celui-ci. Ces données, qui résultent de l'analyse des fragments d'ARN résistant à une hydrolyse ménagée, lorsque la protéine est combinée à l'ARN, ont reçu dans certains cas la confirmation des études en microscopie élec-

tronique. Le mode d'interaction des protéines et ARN ribosomiques a pu être précisé dans de nombreux cas et, plus particulièrement, dans l'analyse des complexes S_4 - ARN 16 S ou L_5 , L_{18} , L_{25} - ARN 5 S. L'interaction fait intervenir des portions définies de la protéine, portions dont la nature peut être déduite de l'étude de complexes artificiels formés entre protéine d'un mutant ribosomique défini et l'ARN 16 S : ainsi, dans le cas de la protéine S_4 , il paraît établi que la portion C-terminale est impliquée dans la formation du complexe. Les interactions de nature électrostatique jouent certainement un rôle privilégié, comme le révèlent les études de méthylation chimique des résidus ϵ - NH_2 de la lysine sur la protéine libre ou combinée.

De nombreux paramètres physicochimiques de l'interaction protéine-ARN ont fait l'objet, dans ce cours, d'une discussion approfondie. L'étude du déplacement par la protéine combinée de colorants acridiniques intercalés entre les paires de bases au sein de l'ARN 16 S amène à conclure que les protéines se combinent de façon privilégiée aux régions en structure hélicoïdale du polymère nucléique.

Un volet très important de l'étude des ribosomes consiste dans la tentative, actuellement réalisée en de nombreux laboratoires, de préciser la disposition topologique des protéines. Ceci est désormais rendu possible par les expériences de reconstitution *in vitro* (Nomura). L'emploi d'agents de pontage bifonctionnels, l'analyse des effets de protéolyse ménagée, enfin l'examen direct en microscopie électronique des « dimères » formés entre ribosomes et anticorps dirigés contre une protéine spécifique fournissent aujourd'hui des résultats d'une grande précision, qui révèlent l'extraordinaire complexité d'une organelle, autrefois considérée comme un simple « granule cytoplasmique ».

L'étude des adaptateurs a été dominée, dans ces dernières années, par le souci d'expliquer les mécanismes et lois de « reconnaissance » des ARN de transfert par leurs amino-acyle-RNA synthétases spécifiques. Dans ce cours, on s'est donc attaché à dresser une sorte de bilan critique des résultats, d'ailleurs fort nombreux, qui cernent cette question. De l'analyse des interactions homo-spécifiques, homologues et hétérologues (cas d'une synthétase d'origine donnée interagissant avec des tARN de même espèce mais de types variés) ou d'interactions hétérospécifiques (synthétases interagissant avec des tARN homo- ou hétérotypiques dérivant d'une espèce biologique différente) un certain nombre de principes directeurs ayant trait à la « reconnaissance » des adaptateurs par les enzymes d'activation semblent se dégager : l'acylation de l'adaptateur en position 3'OH terminale fait intervenir deux « niveaux » de reconnaissance, un niveau primaire qui implique un emboî-

tement approximatif sur une conformation d'ensemble, probablement commune aux tARN hétérotypiques d'une espèce donnée, puis un niveau secondaire qui consiste dans un emboîtement plus précis permettant l'estérification terminale du résidu amino-acyle sur le bras dit accepteur (extrémité porteuse de la séquence CCA).

L'étude de la structure tridimensionnelle des tARN est d'ailleurs entrée dans une phase nouvelle depuis que, par diffraction aux rayons X, deux laboratoires sont parvenus à préciser les emplacements relatifs des atomes avec une résolution d'environ 4 Å. Le tARN aurait la forme d'un L inversé dont le coude comprendrait la boucle T ψ CG, l'extrémité de la barre mineure étant constituée par la séquence estérifiable (CCA) et celle du bras majeur par la bouche de l'anticodon. Le modèle de Rich-Klug-Clark et collaborateurs permet le maximum d'empilement des plans des bases en appariements, et confère de ce fait au tARN une conformation bihélicale du type de celle déjà proposée pour l'ADN.

La dynamique de la traduction génétique — c'est-à-dire l'ensemble des processus d'interactions binaires ou coopératives qui concourent à l'alignement des amino-acyles tARN sur le messenger, au contact des ribosomes, et conduisent à l'assemblage colinéaire des chaînes peptidiques — est ensuite analysée selon un plan de découpage temporel : on distingue, en effet, communément les étapes d'*initiation* (ou de mise en route), d'*élongation* et de *terminaison*. L'ensemble des processus fait intervenir une dizaine de protéines (encore appelées facteurs) en plus des quelque 60 protéines ribosomiques qui entrent dans la constitution d'un ribosome de type procaryotique (70 S). On sait, depuis les travaux des écoles française et anglaise, que toutes les chaînes protéiques admettent la méthionine comme résidu premier lors de leur assemblage. Chez les organismes procaryotiques, ce résidu offre la particularité d'être formylé, ce qui confère sans doute une réactivité spéciale au groupe carbonyle, propice à la formation du premier lien peptidique. Un adaptateur particulier met en place le résidu N-formyl-méthionine sur le complexe ribosome-messenger au voisinage d'un triplet spécial, la séquence AUG, elle-même incluse dans une portion du « messenger » appelée « signal d'initiation ». Les signaux d'initiation possèdent certaines caractéristiques en commun, notamment la séquence qui leur permet de former des appariements transitoires avec une région *complémentaire*, présente dans l'ARN 16 S au voisinage de l'extrémité 3'OH terminale. Le tout premier événement dans la protéosynthèse cellulaire peut donc être défini comme la fixation du tARN initiateur sur la particule 30 S, elle-même déjà « positionnée » sur le signal initiateur du messenger. Cette opération met en œuvre trois facteurs protéiques, IF₁, IF₂ et IF₃, dont les propriétés physico-chimiques sont désormais bien connues et dont les rôles commencent à être entrevus.

IF₃ permettrait au ribosome 30 S (sorte de tête chercheuse) de « cribler » les différentes séquences de l'ARN messager et favoriserait l'appariement avec le signal initiateur. IF₂ est le véhicule spécifique pour le tARN initiateur, IF₁ facilitant l'éviction de la protéine IF₂ au stade où se reforme le dimère.

Par des expériences de reconstitution artificielle, corroborées en partie par l'analyse des effets d'anticorps dirigés contre les protéines du ribosome, il semble que l'on puisse attribuer à la protéine S 12 un rôle de premier plan dans la formation du complexe initiateur. D'autres protéines (S 1, S 11, S 14, S 19) interviennent aussi, soit qu'elles facilitent (S 1) l'appariement messenger-ribosome, soit qu'elles jouent un rôle dans l'interaction des facteurs avec ces organelles. La situation chez les eucaryotes apparaît plus complexe dans la mesure où les ribosomes sont plus volumineux et où le nombre de facteurs d'initiation est lui-même plus élevé.

L'étape d'élongation est d'un abord expérimental plus facile, puisque les résidus internes à la chaîne protéique en croissance sont mis en place par un complexe ternaire bien défini. Il s'agit de l'association entre la protéine EF_{Tn}, le GTP et l'amino-acyle tARN considéré. De très grands progrès ont été réalisés dans l'analyse physicochimique du complexe. Tu se présente comme une protéine « bi ou poly fonctionnelle » siège de transconformations allostériques multiples, les groupes SH jouant un rôle clé dans ces transconformations. La protéine « oscille » entre un état conformationnel de haute affinité pour le ribosome 50 S et un état de faible affinité, l'oscillation régissant les étapes de fixation et d'éviction. Au sein de la particule 50 S, les protéines L₇ et L₁₂ jouent un rôle capital dans la fixation du facteur EF_{Tn} ainsi que de facteur de translocation, EF_G. Elles représentent donc les constituants princeps du « site A », c'est-à-dire de la conformation ribosomique qui permet l'arrivée des « adapteurs » au cours de l'élongation. L'étape de terminaison présente des particularités très remarquables. A l'image de l'initiation, elle fait intervenir la « reconnaissance » par des facteurs spécifiques (R 1 ou R 2) de triplets dits « triplets d'interruption » ou encore « terminateurs » (UAA, UAG ou UGA). Un troisième facteur (R₃) agit en diminuant le K_m apparent de R₁ et R₂ pour le ribosome 50 S.

Le reste du cours est consacré à l'analyse critique du problème des régulations de nature post-transcriptionnelle. Les situations évoquées concernent les effets de l'infection phagique sur la reconnaissance des signaux initiateurs du messager (rôle possible des facteurs dits d'interférence), l'influence de certains groupes prosthétiques tels que l'hémine, sur le processus de biosynthèse des chaînes de globine dans les cellules de réticulocytes et, enfin, l'activation des messagers masqués (informosomes) dans les phases terminales de la différenciation (cas de la myogenèse *in vitro*).

SÉMINAIRES

Divers séminaires portant sur des expériences récentes dans le domaine de la traduction génétique sont venus apporter des éclairages complémentaires :

D^r D. HAYES (Paris), *La biosynthèse des ribosomes* ;

Prof. J.-P. EBEL (Strasbourg), *Structure et modèles d'organisation des ribosomes* ;

D^r A.-L. HAENNI (Paris), *Les ARN de virus et leurs propriétés acceptrices d'acides aminés* ;

D^r P. BOULANGER (Lille), *Propriétés des amino-acyles RNA synthétases. Rôle de la duplication génique dans l'évolution des protéines* ;

D^r M. GRUNBERG-MANAGO (Paris), *Données récentes sur l'interaction des facteurs d'initiation et des ribosomes* ;

Prof. P. FELLNER (Londres), *Signaux de ponctuation dans les ARN messagers de virus animaux* ;

Prof. P. PARMEGIANI (Berlin), *Facteurs d'élongation* ;

D^r DARLIX (Paris), *Réarrangements moléculaires dans les messagers phagiques. Rôle de la RN^{ase} III* ;

D^r M. BUCKINGHAM (Paris), *Régulation post-transcriptionnelle au cours de la différenciation myogénique* ;

D^r J. NINIO (Paris), *Chimie prébiotique. Evolution du code génétique. Cinétique des systèmes de reconnaissance.*

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

BIOCHIMIE CELLULAIRE

I. GROUPE DE RECHERCHE DE L'INSTITUT PASTEUR

A - Aspects biochimiques du transfert de l'information génétique

1. Transcription. Protéines liées au chromoïde. Facteurs H

(J. YANIV, M. CRÉPIN, F. GROS)

Nos recherches sur l'inventaire et les propriétés des protéines manifestant une haute affinité pour l'ADN natif des procaryotes — notamment des

facteurs « H » — a été poursuivie. A côté des protéines H_1 et H_2 , une nouvelle composante, H_u , a été mise en évidence par chromatographie d'affinité sur colonne d'ADN cellulosique. Constitué de deux chaînes identiques de 12 000 daltons, ayant un p. i. 8,7, H_u est comme les deux autres facteurs une protéine thermostable qui stimule de 10 à 15 fois la transcription de l'ADN de λ . Une étude plus systématique des protéines présentes dans le chromoïde « natif » d'*E. coli*, préparé selon la technique de Worcel, révèle l'existence d'une famille hétérogène d'éléments à faibles masses moléculaires, parmi lesquels figurent les « facteurs H ». Ainsi près de 20 000 molécules de H_1 et de H_u sont trouvées associées au chromoïde. La composition de H_u s'apparente beaucoup à celle de l'histone H_{2B} . H_u et H_{2B} possèdent la même teneur en lysine, le même rapport lysine/arginine et la même composition molaire en de nombreux résidus d'acides aminés. Cette situation nous paraît digne d'intérêt dans la mesure où elle révèle pour la première fois l'existence, chez les bactéries, d'une protéine considérée jusqu'ici comme spécifique de l'appareil chromosomique des organismes supérieurs (eucaryotes) (Travaux réalisés en collaboration avec G. Cohen). Il se pourrait donc que les facteurs « H » d'*E. coli* constituent des formes « primitives » d'histones qui interviendraient dans l'organisation tridimensionnelle du chromoïde. Hormis ce rôle comme éléments structuraux purs, ces protéines semblent également agir sur l'équilibre conformationnel des promoteurs. Ceci ressort d'études poussées sur les effets de H_1 dans la transcription de l'opéron lactose.

2. Traduction

(D. LAZAR, J. THIBAUT, J.-C. LELONG, C. JEANTET, F. BERTHELOT, F. GROS)

L'année 1974 a vu l'achèvement de nos travaux sur la cartographie fonctionnelle des protéines du ribosome 30 S, l'étude du déterminisme génétique de la protéine S_{12} ainsi que des interactions entre facteurs d'initiation et ribosome.

3. Régulation des fonctions virales au cours du développement du phage lambda. Interactions phage-bactérie

(P. KOURILSKY, O. MERCEREAU, W. FIRSHEIN, D. GROS, F. BRÉGÈRE)

Une nouvelle orientation a été donnée à l'étude des protéines de régulation pouvant moduler le programme du développement viral. Elle a consisté dans l'isolement — pour la première fois — de structures chromoïdiennes natives du phage sous forme de complexes nucléo-membranaires. Deux formes ayant des propriétés hydrodynamiques différentes ont été isolées.

Cette dualité paraît en relation avec l'état de répllication du virus. L'analyse des protéines liées au chromosome viral est en cours.

L'étude du mode d'expression de l'opéron « lac » après thermo-induction d'un lysogène (effet « Buttin ») pour un phage λ lac porteur d'une mutation « cro » a permis de montrer que deux « modes » de régulation sont mis en œuvre : l'un, indépendant de l'AMP cyclique, conduit à la formation d'un messenger non traduisible (phénomène de « read through ») ; l'autre, dépendant du nucléotide cyclique, est lié à une réinitiation au promoteur lac.

L'interférence entre P_2 et λ — phénomène classique entraînant la mort de l'hôte — a pu être mise au compte d'une destruction très rapide des ARN de transfert de la bactérie. Il semble qu'intervienne une endonucléase spécifique qui cliverait le tARN au niveau de l'anticodon.

Enfin, les premiers travaux de recombinaison artificielle entre fragments provenant du découpage par l'enzyme de restriction Eco R_1 de chromosomes λ lac ne possédant qu'un nombre restreint de sites pour cette nucléase ont conduit à toute une série de premiers résultats qui pourraient être exploités sous peu pour l'insertion de génomes eucaryotes (Travaux réalisés en collaboration avec le laboratoire d'H. BUC).

B - Polyome

Les résultats les plus saillants ont concerné :

1. L'établissement d'une carte physique de l'ADN de polyome

La position des sites de coupure provoquée par l'enzyme de restriction Hin II a été établie par microscopie électronique. La fragmentation par les enzymes Hin II et Hin III, ainsi que la localisation des sites d'attachement de la protéine 32, ont permis de compléter l'orientation de la carte physique du virus. Les sites d'initiation de la transcription par les polymérasés d'*E. coli* ou de thymus ont également été localisés grâce à la technique de Dubochet (Travail en collaboration avec O. CROISSANT et POUDET).

2. La caractérisation des complexes nucléoprotéïniques servant de matrices de répllication et de transcription

Il a été montré que le complexe isolé par lyse ménagée de cellules ou de noyaux infectés se trouve sous la forme d'un « minichromosome » renfermant des « nucléosomes » de 100 Å de diamètre. L'étude des protéines présentes et de leur relation avec les antigènes viraux est en cours.

C - *Différenciation cellulaire*

(D. CAPUT, M. BUCKINGHAM, J. MERLIE, R. WHALEN, S. GOTO, E. FRANKLIN, A. COHEN, F. GROS)

Une partie de nos travaux sur la différenciation des cellules de muscle embryonnaire en culture primaire *in vitro* a concerné la régulation du gène myosine. La transcription « précoce » du gène codant pour la grande sous-unité (messager 26) a été confirmée. L'accroissement du taux de synthèse de myosine aux phases terminales de la différenciation paraît donc reposer pour une large part sur une régulation *post-transcriptionnelle* : en effet, dans les cellules de myoblastes dits « présomptifs », les messagers 26 S précoces sont relégués dans des nucléoprotéines cytoplasmiques métaboliquement instables et ne sont pas traduits. Quelques heures avant la fusion, le messager de la myosine apparaît dans des nucléoprotéines stables. Enfin, dans les stades terminaux de la myogenèse (après formation des myotubes), le messager 26 S est activé en tant que matrice pour la grande sous-unité de la myosine et figure alors dans le compartiment polysomique. Pour préciser la nature des régulations mises en œuvre, nous avons entrepris la purification des facteurs d'initiation liés aux ribosomes de muscles embryonnaires. Nous rechercherons si leur spectre varie pendant la myogenèse et quels changements moléculaires (extrémités 5'-terminales, poly A, etc.) subit le messager 26 S.

L'étude de la biosynthèse du récepteur cholinergique a été poursuivie (en collaboration avec le groupe de J.-P. CHANGEUX). La purification du récepteur des myotubes de veau fœtal est désormais possible par chromatographie d'affinité sur colonne de neurotoxine liée au Sépharose. De plus, certains anticorps contre le récepteur de l'organe électrique du gymnote réagissent avec le récepteur des myoblastes de veau. Ces approches permettront de suivre la biosynthèse et le métabolisme du récepteur pendant la myogenèse et d'analyser les incidences de contact pseudosynaptiques après cocultures avec des cellules nerveuses.

Enfin des mutants spontanés de la lignée établie L₅ (myoblastes de rats) ont été isolés. Chez l'un d'eux (L₅ 5219) la biosynthèse de myosine est « déréprimée » dans la mesure où elle a lieu à un taux très élevé, *même pendant la phase de divisions mitotiques*. Chez un autre (L₅CAMPO), l'ARN messager 26 S n'est jamais transcrit. Ces deux lignées « mutantes » sont incapables de former des myotubes dans des conditions où la souche parentale manifeste une proportion très élevée de foyers de fusions myogéniques. Ces mutants devraient s'avérer précieux pour l'étude des relations entre le déclenchement de la myogenèse terminale (synthèse des protéines contractiles) et l'arrêt des mitoses, ainsi que pour analyser le mécanisme d'activation du messager 26 S.

II. ÉQUIPE DU COLLÈGE DE FRANCE

A - Aspects cellulaires et moléculaires de la diversification phénotypique et de la spécification fonctionnelle dans des clones de neuroblastome de souris

Cette année, nos recherches s'adressent plus particulièrement aux problèmes suivants :

1. Étude de quelques paramètres métaboliques et membranaires spécifiant le phénotype cholinergique

(A. KATO, P. LEFRESNE, Y. NETTER)

Cette étude résulte d'une collaboration avec M. P. LEFRESNE, de l'équipe de M. J. GLOWINSKI au Collège de France. Trois aspects ont été abordés :

a) L'étude quantitative de l'enzyme choline-acétyl-transférase (CAT) et du taux du transmetteur acétyl-choline (ACh) dans des clones cholinergiques du neuroblastome a permis de constater que la quantité d'ACh présente dans les cellules n'est pas directement proportionnelle à l'activité choline acétylasique décelable dans leurs extraits.

b) L'étude de l'origine métabolique du radical acétyl de l'ACh indique que les cellules du neuroblastome peuvent utiliser soit le glucose soit l'acétate. Une partie non négligeable de l'ACh provient du ^{14}C -acétate, même lorsque la réaction se déroule en présence de fortes concentrations de glucose. La vitesse de synthèse est, dans tous les cas, stimulée par l'addition de choline.

c) Etudes sur le « captage » (« uptake ») des précurseurs de l'ACh. Un captage à haute affinité (bimodale) de l'acétate a été mis en évidence dans les clones cholinergiques, indiquant l'existence d'une perméase dont le K_m pour son substrat est de l'ordre de $30 \mu\text{M}$. Des lignées de cellules non cholinergiques incorporent l'acétate uniquement par transport passif (linéaire). En ce qui concerne la choline, l'existence d'un transport actif, sensible à l'inhibition par l'hémicholinium, a été observée.

2. Effets des inhibiteurs métaboliques et des facteurs biologiques sur l'expression des fonctions propres à la cellule différenciée

(Y. NETTER, G. MERLIN)

Cette étude a été entreprise afin d'examiner la régulation de la synthèse des macromolécules au cours de la conversion de cellules neuroblastiques en cellules ayant un phénotype neuronal. Une série de clones de neuroblastomes ont été mis en présence de concentrations différentes d'agents bloquant la

synthèse des macromolécules (protéines, ARN, ADN) notamment la cycloheximide, l'actinomycine-D, la cordycépine, l'aminoptérine et la cytosine-arabinoside. Tous ces agents provoquent une inhibition de la croissance des neurites à des degrés variables selon l'agent et le clone testé. Afin d'améliorer la reproductibilité de ces expériences, nous avons mis au point un système de cultures synchrones qui permet de comparer le comportement de cellules de clones différents à des stades similaires du cycle cellulaire. Les effets d'anti-métabolites et de facteurs de croissance biologiques sur l'expression phénotypique sont actuellement réexaminés au niveau cellulaire et moléculaire sur des cellules synchronisées.

3. *Étude immunologique des antigènes de surface de clones de neuroblastome de souris*

(Y. NETTER et A. MORET)

Cette étude a pour but : a) d'analyser les antigènes de surface de clones ayant des phénotypes morphologiques et/ou biochimiques différents ; b) de suivre l'évolution de ces antigènes au cours de la transformation, en culture, de cellules blastiques en cellules neuronales ; c) de vérifier si ces antigènes se trouvent aussi sur les cellules analogues de clones de neuroblastome, notamment sur les cellules de ganglions du système nerveux périphérique.

La première étape a consisté à examiner deux groupes d'antigènes connus : H-2 (antigène d'histocompatibilité de la souris) et « θ » (antigène des thymocytes présent aussi dans le système nerveux central). Six clones différents ont été examinés par cytotoxicité directe en présence de complément. Tous les clones possèdent des antigènes H-2 typiques de la souche d'origine, mais aucun n'a donné une réaction positive avec l'antisérum anti- θ . L'évolution possible de ce dernier antigène au cours de la différenciation sera examinée prochainement par l'immunofluorescence.

La deuxième étape a consisté à immuniser des animaux, afin d'obtenir des anticorps dirigés contre les composants de surface de nos clones. Des lapins, des rats et des souris isogéniques ont été immunisés avec des cellules différenciées. Un groupe de souris a été également injecté avec des cellules blastiques. Le pouvoir cytotoxique des antisérums obtenus a été étudié par la méthode quantitative selon BRUNNER (mesures de libération du ^{51}Cr par des cellules « cibles » préalablement marquées et soumises à l'effet des anticorps en présence de complément). Les spécificités croisées sont analysées par des adsorptions quantitatives. Les résultats obtenus à ce jour peuvent être résumés ainsi : les antisérums de rats ne se montrent que faiblement positifs, et toute l'activité semble résider dans les anticorps anti-espèce. Les anticorps de lapins ont un titre appréciable après trois cycles

d'immunisation. Une partie de ces anticorps sont non spécifiques et peuvent être éliminés par adsorption ; les anticorps restants semblent spécifiques des clones de neuroblastome. Ici nous avons pu constater l'existence de réactivités croisées entre les clones différents et entre les cellules blastiques et les cellules différenciées. Cependant, il semble que des différences quantitatives importantes apparaissent dans les antigènes communs, entre les clones. L'analyse des spécificités antigéniques propres à des phénotypes spécifiques est actuellement en cours d'étude.

Les antisérums les plus intéressants sont ceux obtenus chez les souris isogéniques immunisées avec les cellules différenciées. L'analyse de ces antisérums est actuellement en cours.

B - *Aspects biochimiques de l'expression génétique au cours de la différenciation du neuroblastome*

1. *Traduction* (L. LEGAULT)

Le passage d'une cellule génétiquement déterminée de l'état indifférencié à l'état différencié doit mettre en jeu des changements dans le mécanisme de transcription, mais aussi probablement dans le processus de traduction permettant ainsi la synthèse des protéines nécessaires à la différenciation et à la survie de cette cellule. Tel doit être le cas de la cellule nerveuse.

Pour étudier la nature des modifications pouvant se faire jour au niveau de la traduction, nous nous sommes adressés à des lignées clonales isolées à partir d'une tumeur spontanée de la moelle épinière de souris C 1300, capables d'être maintenues indéfiniment en culture *in vitro* à l'état non différencié. Une fois privées de sérum et sur un support convenable, elles se fixent rapidement et présentent des changements morphologiques et biochimiques tels qu'une extension de neurites et l'accroissement d'activités enzymatiques spécifiques de la cellule normale.

L'étude du mécanisme de traduction, c'est-à-dire l'utilisation de systèmes *in vitro*, suppose la mise au point d'un système de culture en masse qui a été l'objet de nos premières préoccupations.

Les premiers résultats paraissent indiquer que des extraits acellulaires (surnageant post-mitochondrial) sont actifs, l'extrait de cellules différenciées présentant une activité spécifique 6 à 8 fois plus grande que celle de l'extrait issu de cellules non différenciées.

Il apparaît également qu'une incubation du système dans des conditions de synthèse protéique permet l'élimination de l'activité endogène, ce qui rend

ce système susceptible d'être utilisé aisément pour l'étude de la traduction de messagers homologues et hétérologues exogènes.

L'activité de traduction endogène de l'extrait relève uniquement du mécanisme d'élongation de chaînes polypeptidiques. La reproductibilité de ces résultats vérifiée, nous nous proposons de tenter quelques approches. Deux types de changement de nature post-transcriptionnelle sont à envisager :

a) Les ARN messagers spécifiques de la différenciation pourraient être présents déjà dans les cellules non différenciées, mais seraient intraduisibles de par leur structure même. L'étude de la traduction des ARN polysomiques et non polysomiques issus de cellules différenciées ou pas devrait conduire à des observations intéressantes.

b) On peut également supposer que, lors de la différenciation, il apparaît une activité stimulatrice de traduction de certaines espèces d'ARN messagers, en particulier ceux qui correspondent aux protéines spécifiques de la différenciation comme cela semble être le cas pour l'acétylcholine estérase.

2. *Transcription* (B. CROIZAT)

Nous avons adapté aux clones de neuroblastomes (N 115 de NIRENBERG et C 6 de Y. NETTER, dérivant de la tumeur C 1300) une méthode d'extraction et d'analyse de mRNA.

En règle générale, les cellules étaient lysées dans un tampon d'extraction à pH 7,5 par 0,1 % de NONIDET, en présence de 250 γ /ml d'héparine. Dans ces conditions, les noyaux ne sont pas lésés et il n'apparaît pas, sur le gradient, de matériel d'origine nucléaire.

Le surnageant est déprotéinisé par un mélange de chloroforme + phénol et alcool isoamylique.

Les RNA, précipités par l'éthanol, sont séparés sur un gradient de saccharose 5-20 %, et les RNA contenant du poly A sont analysés par hybridation sur des filtres de fibres de verre contenant du poly U.

Cette technique a été appliquée à deux types bien distincts de cellules : a) les cellules en suspension, rondes, non différenciées ; b) les cellules attachées au substrat, qui ont formé de longs neurites.

Les RNA messagers riches en poly A des cellules non différenciées se distribuent selon un profil de type « polydispersé », avec 5 pics d'importance grossièrement semblable.

Les profils correspondant aux cellules différenciées révèlent un accroissement relatif, sensible, d'un pic, dans la région 23 - 26 S.

Ces études seront étendues à l'analyse de la distribution intracellulaire des espèces polynucléotidiques de type messenger à travers les différents compartiments cytoplasmiques. On s'attachera également à préciser le degré de renouvellement métabolique des messagers au cours de la différenciation.

ENZYMOLOGIE

Le groupe de recherche du CNRS n° 006, dirigé par M. NGUYEN VAN THOAI, a poursuivi des travaux sur la structure et le mécanisme d'action des protéines enzymatiques et contractiles.

A - Centre actif des enzymes et mécanisme de réaction

a) L'hexokinase renferme deux résidus carboxyles essentiels qui peuvent être bloqués par un carbodiimide en présence de nitrotyrosine éthyloester (D. B. PHO, C. ROUSTAN, G. DESVAGES, L.-A. PRADEL et N. v. THOAI).

b) L'octopine déshydrogénase renferme un groupe carboxyle essentiel qui a été bloqué par un carbodiimide en présence de N-(dinitro 2,4-phényl)éthylènediamine (C. HUC, A. OLOMUCKI et F. THOMÉ-BEAU).

c) La phosphoglycérate kinase de levure renferme une tyrosine essentielle dont l'iodation entraîne l'inhibition complète de l'enzyme (A. FATTOUM, C. ROUSTAN, L.-A. PRADEL et N. v. THOAI).

d) Les 8 résidus histidyles de l'arginine kinase ont été titrés en résonance magnétique nucléaire à 250 MHz, sur la forme native ou en présence des divers substrats. Seul le complexe enzyme - MgADP - Arg - NO₃⁻, analogue du complexe de transition, modifie plus ou moins toutes les résonances, indiquant un changement conformationnel important de la protéine. Le blocage du résidu histidyle essentiel par le pyrocarbonate d'éthyle est complètement empêché par le même complexe analogue du complexe de transition (L.-A. PRADEL, R. KASSAB et D. B. PHO, en coopération avec M. ROUX du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay).

e) Les études thermodynamiques ont confirmé que des liaisons hydrophobes sont prépondérantes dans l'association de l'octopine déshydrogénase avec le coenzyme. L'utilisation de la technique « stopped-flow » et des substrats deutérés a permis de localiser l'étape limitante de la vitesse de la réaction catalysée par l'octopine déshydrogénase (M.-O. DOUBLET et A. OLOMUCKI, en coopération avec P. LUISI du Polytechnicum de Zürich).

f) Plusieurs analogues d'ATP ont été synthétisés ; ils ont permis de marquer covalentiellement les têtes globulaires de la myosine (E. DER TERROSSIAN, L. PRADEL et R. KASSAB, en coopération avec T. E. BARMAN, chercheur visiteur).

B - Structures

a) La séquence N-terminale de l'arginine kinase a été déterminée : N-acétyl-Ala-Asp-Ala-Ala (F. REGNOUF et R. KASSAB).

b) L'arginine kinase de poids moléculaire 150 000 renferme quatre chaînes polypeptidiques et seulement deux sites de réaction (Y. ROBIN et N. v. THOAI).

c) La M-protéine isolée des myofibrilles de muscle squelettique renferme un pourcentage élevé (environ 30 %) de structure β et peu de structure α -hélice (10 %) (C. ORIOL et M.-F. LANDON).

CHIMIE ORGANIQUE BIOLOGIQUE

L'équipe dirigée par M. M. OLOMUCKI, sous-directeur du laboratoire, a poursuivi des recherches sur la synthèse et les propriétés de différentes molécules d'intérêt biologique.

Une étude comparée des isomaléimides et des maléimides N-substitués a montré que, malgré certains avantages de ces dernières (stabilité, réactivité et spécificité légèrement plus grandes), les deux isomères peuvent être utilisés pour la modification chimique des protéines. L'addition des thiols sur ces composés conduit aux mêmes produits quel que soit l'isomère de départ ; la RMN du ^{13}C a montré que, dans tous les cas, on aboutit aux alkylthio-succinimides symétriques. La formation des complexes de transfert de charges entre les cycles maléimides et les noyaux aromatiques a été mise en évidence. Une possibilité de dosage des maléimides par action de l'hydroxylamine et du chlorure ferrique a été indiquée ; cette méthode a été étendue à la révélation des maléimides en chromatographie sur couche mince ou sur papier.

L'étude de la synthèse et des propriétés de divers types de réactifs de macromolécules biologiques comportant, d'une part, un groupement servant à les attacher sur un site donné du récepteur et, d'autre part, une fonction photoactivable (diazotique ou azide) a été entreprise.

La préparation d'un inhibiteur sélectif de la cholinestérase « 284C51 » (dibromure de bis-[(allyl)diméthylammonio-4 phényl]-1,5 pentanone-3) a pu être considérablement simplifiée et améliorée par rapport au procédé classique.

ENDOCRINOLOGIE

Le groupe de recherche dirigé par le professeur R. MICHEL, Endocrinologie, Université René Descartes, a poursuivi ses travaux sur les effecteurs des oxydophosphorylations, sur la fixation cellulaire des hormones thyroïdiennes et sur leur action au niveau mitochondrial.

A - *Effecteurs des oxydations phosphorylantes mitochondriales*

Les principales recherches ont été consacrées à l'étude des effets de l'acide glyoxylique sur les fonctions des mitochondries isolées. Ce composé ne modifie pas la vitesse respiratoire des particules en état 4, mais la ralentit lorsqu'elles sont placées en état 3. L'inhibition de la consommation d'oxygène, qui n'est pas immédiate, peut être partiellement levée par addition d'un découplant ou d'un thiol. Le glyoxylate, qui freine la consommation d'oxygène stimulée par le 2,4-dinitrophénol ou le strontium, inhibe le transport du phosphate. On a montré que la diminution de la vitesse respiratoire des mitochondries placées en état découplé dans un milieu exempt de phosphate traduit son intervention directe au niveau du transport des substrats hydrogénés ou à celui du transfert des électrons. Le glyoxylate possède donc plusieurs sites d'intervention dans les mitochondries ; il agirait en particulier en bloquant certains groupements -SH par formation d'hémimercaptals.

B - *Sites récepteurs spécifiques de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine*

Les travaux sur les sites récepteurs des hormones thyroïdiennes ont été entrepris sur des leucocytes sanguins de rats normaux et thyroïdectomisés. La respiration des leucocytes isolés de rats thyroïdoprives est plus faible que celle provenant d'animaux normaux, diminution qui correspond à la baisse du métabolisme basal. Les études sur la fixation de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine sur les lymphocytes sanguins de rats thyroïdectomisés ont permis de mettre en évidence la présence de sites saturables et de haute affinité, démontrant ainsi l'existence de sites récepteurs spécifiques. La constante d'association calculée pour la fixation cellulaire de T_3 est de $0,97 \times 10^{12} \times M^{-1}$. Le nombre des sites est faible puisqu'on n'a pu en caractériser qu'une cinquantaine par cellule.

C - *Mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes*

La structure des mitochondries de foie de rats est analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les particules provenant d'animaux nor-

maux et thyroïdectomisés renferment 35 constituants dont les poids moléculaires sont compris entre 10 000 et 135 000 daltons. Le défaut en iodothyronines se traduit par une nette diminution dans la teneur d'un constituant de poids moléculaire 54 000, l'injection de 3,5,3'-triiodo-L-thyronine à l'animal thyroïdectomisé la rétablissant à une valeur proche de la normale. La membrane externe est constituée de 20 fractions protéiques ; l'ablation de la thyroïde n'entraîne pas de modification structurale. On retrouve au niveau du mitoplaste la différence observée avec les mitochondries entières concernant le constituant de poids moléculaire 54 000 qui est diminué par l'hypothyroïdie. Le mitoplaste est fractionné en protéines matricielles, protéines faiblement liées aux membranes, protéines structurales et protéines des cytochromes insolubles a, a₃, b, c₁. Les protéines matricielles hydrosolubles ont des poids moléculaires compris principalement entre 40 000 et 55 000, les composants KCl-extractibles entre 25 000 et 45 000. Les protéines structurales renferment un constituant très spécifique de poids moléculaire 23 000. Les tracés densitométriques obtenus avec des fractions sont les mêmes quel que soit l'état thyroïdien, tandis que le constituant principal des protéines liées aux cytochromes insolubles dont le poids moléculaire est de 54 000 est diminué chez l'animal thyroïdectomisé.

Des recherches analogues sont réalisées avec des mitochondries isolées de muscle squelettique de rat. La vitesse de consommation d'oxygène des mitochondries des rats thyroïdectomisés est abaissée lorsque les particules sont placées dans les états 3 et 4 en présence de divers substrats. L'analyse électrophorétique des mitochondries entières a permis de caractériser 35 constituants protéiques, le composant de poids moléculaire 54 000 daltons étant diminué après thyroïdectomie.

L'injection de chloramphénicol pendant 3 jours à des rats normaux provoque une diminution de la teneur du constituant mitochondrial hépatique de poids moléculaire 54 000. Comme l'antibiotique est un inhibiteur spécifique de la synthèse protéique mitochondriale, il est possible que la synthèse du constituant de poids moléculaire 54 000, sensible aux hormones thyroïdiennes, soit contrôlée par les acides nucléiques mitochondriaux.

COLLOQUES, MISSIONS DIVERSES

M^{me} Y. ROBIN a fait une communication orale au 9^e FEBS Meeting à Budapest, en août 1974.

M^{lle} L.-A. PRADEL et M. R. KASSAB ont participé à la 7^e Hardens Conference à Ashford (Angleterre).

DIPLÔME

M^{lle} Y. ZEITOUN a soutenu avec succès son diplôme d'Ingénieur du Conservatoire national des Arts et Métiers : *Isolement et étude de la structure primaire du peptide renfermant le groupement -SH essentiel de la taurocyamine phosphokinase.*

PUBLICATIONS

T. BOON, M. E. BUCKINGHAM, D. L. DEXTER, H. JAKOB et F. JACOB, *Tératocarcinome de la souris : isolement et propriétés de deux lignées de myoblastes* (Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 1974, 125 B, p. 13-28).

M.-E. BUCKINGHAM, D. CAPUT, A. COHEN, R. G. WHALEN et F. GROS, *The synthesis and stability of cytoplasmic messenger RNA during myoblast differentiation in culture* (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1974, 71, p. 1466-1470).

A. EXPERT-BEZANÇON, M. F. GUERIN, D. H. HAYES, L. LEGAULT et J. THIBAUT, *Preparation of E. coli ribosomal subunits without loss of biological activity* (Biochimie, 1974, 56, p. 77-89).

F. GROS, *Control of gene expression in prokaryotic systems* (FEBS Letters, 1974, 40, S 19 - S 27).

P. KOURILSKY, *Lysogenization by bacteriophage lambda. II. Identification of genes involved in the multiplicity dependent processes* (Biochimie, 1974, 56, p. 1511-1516).

P. KOURILSKY et F. GROS, *Genetic control of transcription* (Proceedings of the International Fogarty. Conférence sur la régulation de l'expression des gènes dans les cellules en culture, 1974, p. 19-41).

P. KOURILSKY et A. KNAPP, *Lysogenization by bacteriophage lambda. III. Multiplicity dependent phenomena occurring upon infection by lambda* (Biochimie, 1974, 56, p. 1517-1523).

P. KOURILSKY, O. MERCEREAU et D. GROS, *A sensitive assay for egg white lysozyme and phage endolysis* (Biochimie, 1974, 56, p. 833-838).

P. KOURILSKY, O. MERCEREAU, D. GROS et G. Y. TREMBLAY, *Hybridization on filters with competitor DNA in the liquid phase in a standard and a micro-assay* (Biochimie, 1974, 56, p. 1215-1221).

J.-C. LELONG, D. GROS, F. GROS, A. BOLLEN, R. MASCHLER et G. STÖFFLER, *Function of individual 30 S subunit proteins of E. coli. Effect of specific immunoglobulin fragments (Fab) on activity of ribosomal decoding sites (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 1974, 71, p. 248-252).*

A. M. MICHELSON et M. E. BUCKINGHAM, *Effects of superoxide radicals on myoblast growth and differentiation (Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 58, p. 1079-1086).*

M. YANIV, W. FOLK, P. BERG et L. SOLL, *A single mutational modification of a tryptophan specific transfer RNA permits aminoacylation by glutamine and translation of the codon UAG (J. Mol. Biol., 1974, 86, p. 245-260).*

M. YANIV, O. CROISSANT et F. CUZIN, *Location of the T₄ gene 32 protein-binding site on polyoma virus DNA (Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 57, p. 1074-1079).*

F. BRÉGÈRE, *Bacteriophage P₂-λ interference : inhibition of protein synthesis involves transfer RNA inactivation (J. Mol. Biol., 1974, 90, p. 459-467).*

C. ROUSTAN, A. BREVET, L.-A. PRADEL et N. v. THOAI, *Yeast hexokinase. Interaction with substrates and analogs studied by difference spectrophotometry (Eur. J. Biochem., 1974, 44, p. 353-358).*

E. DER TERROSSIAN, L.-A. PRADEL, R. KASSAB et G. DESVAGES, *Separation of the two non-identical subunits of lombricine kinase from Lumbricus terrestris muscle by chromatography on Sepharose-mercurial. Isolation of the troptic peptide containing its essential thiol group (Eur. J. Biochem., 1974, 45, p. 243-251).*

Y. ROBIN, *Phosphagens and molecular evolution in worms (Biosystems, 1974, 6, p. 49-56).*

A. BAICI, P. L. LUISI, A. OLOMUCKI, M.-O. DOUBLET et J. KLINCAK, *Influence of ligands on the coenzyme dissociation constants in octopine dehydrogenase (Eur. J. Biochem., 1974, 46, p. 59-66).*

Y. ROBIN et N. v. THOAI, *Tetrameric unspecific arginine kinase with two catalytic subsites (9th FEBS Meeting Abstr., p. 357, Budapest, 1974).*

D. B. PHO, C. ROUSTAN, G. DESVAGES, L.-A. PRADEL et N. v. THOAI, *Essential carboxyl groups in yeast hexokinase (FEBS Letters, 1974, 45, p. 114-117).*

N. v. THIEM, G. LACOMBE et N. v. THOAI, *Comparative study of two ATP : L-arginine phosphotransferases of molecular weight 84 000 (Biochim. Biophys. Acta, 1975, 377, p. 95-102).*

P. L. LUISI, A. BAICI, A. OLOMUCKI et M.-O. DOUBLET, *Temperature determined enzymatic functions in octopine dehydrogenase* (*Eur. J. Biochem.*, 1975, 50, p. 511-516).

M.-F. LANDON et C. ORIOL, *Native conformation of M-protein* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, 62, p. 241-245).

A. FATTOUM, C. ROUSTAN, L.-A. PRADEL et N. v. THOAI, *The tyrosyl residues of yeast 3-phosphoglycerate kinase reactivity toward iodine* (*FEBS Letters*, 1975, 51, p. 18-20).

A. BREVET, C. ROUSTAN, L.-A. PRADEL et N. v. THOAI, *Muscle pyruvate kinase : interaction with substrates and analogs studied by difference spectroscopy* (*Eur. J. Biochem.*, 1975, 52, p. 345-350).

Y. ROBIN, A. GUILLOU et N. v. THOAI, *Unspecific arginine kinase of molecular weight 150 000. Amino acid composition, subunit structure and number of substrate binding sites* (*Eur. J. Biochem.*, 1975, 52, p. 531-537).

M. OLOMUCKI et G. ROURE, *The determination of organic halogenomercury compounds by titration of halide* (*Anal. Chim. Acta*, 1974, 70, p. 478-481).

F.-X. GALEN, R. TRUCHOT et R. MICHEL, *Influence des acides hydroxybenzoïques isolés* (*Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, p. 1367-1377).

F.-X. GALEN, R. TRUCHOT et R. MICHEL, *Mécanisme d'action de l'acide 4-iodosalicylique sur la respiration des mitochondries isolées* (*Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, p. 1379-1385).

A.-M. PONS, M. LUCAS, M.-J. ROMAN et R. MICHEL, *Mise en évidence des sites récepteurs de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine sur les lymphocytes sanguins de rats* (*Comp. Rend. Acad. Sc.*, 1974, 279, p. 517-520).

M. BAUDRY, J.-P. CLOT et R. MICHEL, *Influence de l'état thyroïdien sur le profil électrophorétique des protéines mitochondriales de foie de rat* (*Biochimie*, 1975, 57, p. 77-83).