

## Biochimie cellulaire

M. François GROS, professeur

Des progrès considérables ont été enregistrés, depuis ces trois dernières années, dans l'exploration des propriétés du matériel génétique des organismes supérieurs. Longtemps reléguée dans le domaine de l'analyse cytologique, l'étude des chromosomes et, plus encore, celle de leur substratum, la chromatine, est entrée dans une phase nouvelle ; l'emploi combiné des démarches de la physico-chimie et de la biochimie analytique permet de donner aujourd'hui une représentation moléculaire de l'infrastructure de la chromatine et de cerner avec beaucoup plus de précision les problèmes que posent l'extraordinaire *compaction* du matériel génétique ainsi que sa *repliation* et son *expression*. Ces différents aspects de la problématique ont constitué pour l'essentiel le thème du cours de cette année.

Une première partie est consacrée au cycle de duplication et à la morphologie des chromosomes, aspects certes classiques de la génétique des eucaryotes, mais dont l'appréhension permet de situer avec précision les problèmes plus importants de l'organisation bi et tridimensionnelle du matériel nucléaire, et de dégager les notions essentielles de *chromatide* et de *chromomère*. Le chromomère considéré comme unité morphologique d'expression n'est généralement perçu que dans des situations extrêmes qui en amplifient la fréquence et permettent d'en étudier l'ultrastructure. Ces situations sont rencontrées dans les chromosomes en « *écouvillon* » des oocytes après la méiose et dans les chromosomes *polyténiques* des glandes salivaires d'insectes. Les chromosomes polyténiques ont constitué et continuent de constituer le matériel de choix pour établir des corrélations entre les cartes génétiques fonctionnelles qui assignent aux gènes dits de structure leur emplacement vectoriel relatif et les cartes morphologiques qui décrivent les dispositions et l'épaisseur relative des « bandes », ainsi appelées parce qu'elles sont les lieux de condensation apparente du matériel génétique dans la section transversale du chromosome. La notion « une bande - un gène »

(Juddes; Chovnick) est aujourd'hui étayée par nombre de faits, même si elle paraît souffrir quelques exceptions (dans certains cas, on peut dénoter l'existence de plusieurs bandes très fines pour un gène). Dès lors que le chromomère est défini et que son adéquation au gène est acquise on rencontre cependant un paradoxe frappant lié à ce que le contenu en DNA moyen est éminemment variable d'un chromomère à l'autre et que la quantité de DNA présente dans certains chromomères paraît anormalement élevée. Un même paradoxe apparaît lorsque l'on cherche à établir une estimation de nombre maximum de gènes présents dans une cellule eucaryote en fonction du nombre de types de protéines potentiellement élaborées par cette cellule et la quantité de DNA présente par noyau haploïde. Il est clair qu'un très *gros excès* de DNA réside dans les structures chromosomiques par rapport à ce que l'on attendrait si tous les gènes de structure représentaient la majorité du chromatide et ne figuraient qu'une seule fois par séquence informationnelle, comme c'est le cas chez les bactéries par exemple. Ces considérations conduisent à discuter de l'organisation du DNA des eucaryotes.

L'étude de la « complexité cinétique » du DNA, établie en fonction du comportement du DNA nucléaire après cisaillement, dénaturation et renaturation (Britten, Kohne, Davidson) a permis de dégager plusieurs « classes » ou « compartiments » virtuels au sein du matériel génétique des eucaryotes : a) un compartiment composé de séquences très fréquemment répétées, celui dit des « ADN satellites », qui sont relégués dans l'hétérochromatine nucléolaire ou extranucléolaire. Les ADN satellites sont en général constitués par de très courtes séquences de 6 à 12 paires de bases, répétées plusieurs centaines de milliers de fois. Ces séquences ont divergé considérablement au cours de l'évolution selon des lois actuellement bien comprises ; elles ne sont pas transcrites en RNA et on leur attribue un rôle essentiellement structural. b) Des séquences à fréquence moyenne de répétition. c) Des séquences dites « uniques », auxquelles est dévolue une fonction de codage pour les protéines spécifiques. A cette distribution il faut ajouter les séquences très fréquentes que l'on rencontre dans l'organisation nucléolaire : servant déléments de codage pour les RNA ribosomiques, elles sont répétées des dizaines de milliers de fois et sont séparées par des intercalaires (« spacers »). Les travaux de Britten et Davidson indiquent que 50 à 70 % du génome haploïde des organismes supérieurs est constitué par un entrelac de courtes séquences répétées quelques milliers de fois (leur longueur équivaut en général à 300 paires de bases), et de séquences uniques. Plusieurs séquences « uniques » peuvent être coadjacentes à une seule séquence répétée. Chez certains organismes (drosophile), les séquences répétées sont plus longues. Des résultats récents permettent de supposer que les séquences répétées seraient des signaux de ponctuation, ou mieux des gènes régulateurs commandant l'expression des gènes à séquences uniques. Plusieurs modèles

(Paul, Georgiev, Crick) permettent d'entrevoir le fonctionnement de ces éléments de régulation.

Une fois énoncées ces prémisses, le cours comporte une description très détaillée des constituants principaux de la chromatine et de son mode d'organisation. La chromatine est en effet composée, le plus souvent, de DNA et d'*histones* en proportions stoechiométriques, de protéines dites « non histones » (NHP) et de RNA. Les histones les plus fréquemment rencontrées sont de cinq types principaux et on les classe en fractions riches en lysine ( $H_1$ ), modérément riches en lysine ( $H_{2a}$ ,  $H_{2b}$ ) et riches en arginine ( $H_3$ ,  $H_4$ ). Dans les cellules d'érythrocytes d'autres histones ( $H_5$ ) sont également présentes. La *composition* en acides aminés et, dans un certain nombre de cas, la séquence des histones ont été déterminées. Ceci débouche sur trois considérations générales : 1°) les séquences des histones  $H_3$ ,  $H_4$  varient très peu cours de l'évolution. Celles des histones  $H_{2a}$   $H_{2b}$  varient davantage, encore qu'elles aient conservé des motifs suffisamment communs pour être reconnaissables par immunoprécipitation en présence de complément. Les histones  $H_1$  ont été le siège de dérives évolutives fréquentes. 2°) De nombreux résidus d'histones peuvent subir des « modifications » intervenant après synthèse de la chaîne peptidique. Ces modifications consistent en des N-acétylations (terminales ou internes), des phosphorylations, des méthylation, etc. Elles jouent sans doute un rôle très important dans la régulation de l'état de compaction de la chromatine (Bradbury) ou de son expression. 3°) Les histones comportent des distributions internes, non monotones, de régions fortement chargées et hydrophiles, et de régions hydrophobes, les régions hydrophiles étant fréquemment reléguées en extrémité de chaîne et jouant un rôle capital dans l'attachement au DNA, les régions hydrophobes intervenant dans les interactions protéine-protéine.

Après avoir passé en revue les principales propriétés physico-chimiques des histones en solution, soit envisagées isolément soit en mélange, on s'est attaché à faire le point des connaissances sur le mode d'association des histones au sein de la chromatine. Les études en microscopie électronique (Ollins, Chambon, etc.), celles qui portent sur le comportement de la chromatine après digestion ménagée (Noll, Kornberg, Van Holde, Chambon, etc.), enfin l'étude de la chromatine par diffraction aux rayons X (Bram et Ris) ou par diffraction de neutrons (Bradbury) conduisent à la conclusion très importante selon laquelle la chromatine est organisée en *motifs régulièrement espacés*. L'examen de la chromatine en microscopie électronique a en effet révélé (Ollins) que la chromatine native comportait une série de structures globulaires — appelées « v bodies » ou nucléosomes — d'environ 100 Å de diamètre, disposées le long de l'axe du chromatide comme les perles d'un collier. Après digestion ménagée par les endonucléases, ces « nucléosomes » peuvent être libérés et leurs propriétés chimiques et physico-

chimiques étudiées. Ces corpuscules sont de fait formés par l'association d'un segment de DNA de 200 paires de bases, enroulé autour d'un « core » protéique formé lui-même par l'association de 4 paires d'histones parmi lesquelles figurent  $H_{2a}$ ,  $H_{2b}$ ,  $H_3$  et  $H_4$ . Des études plus approfondies faisant intervenir des agents de pontage indiquent que l'assemblage histonique comprend un noyau central de structure  $(H_3)_2 (H_4)_2$ , ou tétramère, lié à deux paires de structure  $(H_{2a}) (H_{2b})$ , par l'intermédiaire des histones  $H_3$  du noyau. Une digestion un peu plus prolongée ramène la dimension du fragment de DNA à 140 paires de bases, de sorte que 60 paires de bases constitueraient un élément de liaison non associé au core, et rattaché de manière plus lâche au nucléosome. Le taux de compaction du DNA dans le nucléosome est voisin de 6.0. Par ailleurs, le DNA internucléosomique — c'est-à-dire situé entre deux globules consécutifs — serait associé à l'histone  $H_1$  (Modèle de Kornberg, Crick, Chambon). Les études de diffraction aux rayons X et de diffraction de neutrons indiquent très clairement que, dans la chromatine, le DNA se trouve enroulé à l'extérieur des globules histoniques (Bradbury). Cet enroulement ne ferait pas intervenir une torsion uniformément répartie le long de la double hélice mais plutôt une série de coudes aux pliures angulaires (« kinks ») dont F. Crick a envisagé les modèles les plus plausibles.

Cette structure ne rend pas totalement compte de toutes les propriétés physico-chimiques et notamment du très haut degré de compaction de la chromatine native. Il apparaît évident que celle-ci admet plusieurs superenroulements de groupes de nucléosomes (modèle en solénoïde de Crick ou modèle en ressort de Bram et Ris).

La dernière partie de notre enseignement a été consacrée aux propriétés et au rôle probable des protéines dites « non histones » de la chromatine (fraction NHP). Leur catalogue est complexe et leur classification difficile du fait de la multiplicité des types qui la composent. Certains procédés généraux de fractionnement (colonne d'hydroxylapatite par exemple) leur sont applicables. Comme les histones, les protéines « non histones » sont phosphorylables ou acétylables. Il est admis que, puisque les histones ont des séquences très peu variables d'une espèce à l'autre et qu'elles s'associent au DNA selon un arrangement régulier mais de façon non spécifique, ce sont les protéines « non histones » qui doivent receler les éléments de régulation qui restreignent les capacités d'expression de la chromatine. Divers laboratoires ont tenté d'appréhender ce problème par des expériences de *reconstitution*, dans lesquelles l'ensemble des protéines non histones émanant d'une cellule douée de propriétés phénotypiques données (ex. capacité à synthétiser l'hémoglobine) étaient ajoutées au DNA ou à la chromatine provenant d'une autre cellule présentant des propriétés phénotypiques distinctes. La réassociation avait lieu après dialyse contre des tampons de

force ionique décroissante et l'on recherchait si la chromatine ainsi reconstruite pouvait servir de matrice dans l'expression des propriétés de la cellule donneuse. Des résultats très encourageants ont notamment été obtenus en croisant les protéines non histones d'érythrocytes avec la chromatine du cerveau de souris. La transcription d'une telle chromatine engendre *in vitro* des séquences caractéristiques du gène de la globine (J. Paul, Felsenfeld). Bien que ces expériences ne soient pas à l'abri de critiques (contaminations possibles du matériel transcrit par des messagers endogènes) elles ouvrent des perspectives très intéressantes à l'étude des protéines régulatrices de la chromatine.

#### SÉMINAIRES

L'ensemble des séminaires a été consacré aux propriétés physico-chimiques de la chromatine ainsi qu'aux mécanismes de réplication et de transcription du matériel génétique chez les organismes eucaryotes.

#### ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

#### BIOCHIMIE CELLULAIRE

#### GROUPE DE RECHERCHE DE L'INSTITUT PASTEUR

#### I. — *Travaux sur la régulation génétique dans les systèmes des procaryotes*

#### A. — *Recherches sur les protéines du chromoïde bactérien*

(J. YANIV, R. HASELKORN, F. GROS)

Les travaux sur la protéine Hu ont été poursuivis. Ils ont donné lieu à une publication aux P.N.A.S. (1975, 72, 3428). La cellule d'*E. coli* renferme au moins 40 à 50.000 copies d'une protéine de faible masse moléculaire liée pour une très large part au chromoïde et dont les propriétés sont si proches de celles des histones que l'on peut la désigner par le terme « d'histonnoïde ». Riche en lysine, Hu a une composition en acides aminés très voisine de celle de l'histone H<sub>2</sub>B, un point isoélectrique de 9,0 et un comportement hydrodynamique ou électrophorétique rappelant celui de l'histone

H<sub>1</sub>. En solution de faible ionicité, elle se présente comme un dimère sans pont disulfure, formé de deux sous-unités identiques de masse 7.000 daltons. La protéine mélangée à l'ADN bicaténaire s'y associe et s'y organise en amas réguliers. Le complexe formé avec des fragments définis produits par coupure de l'ADN de  $\lambda$  avec l'enzyme Eco R<sub>I</sub>, a un diamètre apparent de 25-30 Å. Fait remarquable, une protéine ayant des propriétés physiques et immunologiques très semblables à celles de Hu, a été retrouvée dans le chromosome des Algues bleues qui représentent l'un des phylums parmi les plus évolués de la classe des « procaryotes ». De même que les histones d'eucaryotes n'ont subi que fort peu de modifications en cours d'évolution, de même ces histonoïdes (ancêtres possible des histones actuelles) auraient conservé une structure générale quasi invariante dans l'échelle évolutive des organismes procaryotiques.

#### B. — Régulation chez le bactériophage lambda

(P. KOURILSKY, O. MERCEREAU, F. BRÉGÈGÈRE, M. GOTTESMAN, D. GROS)

Les recherches dans le cadre de la régulation génétique chez le bactériophage lambda ont concerné : *l'isolement du chromoïde du phage*, l'étude de la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase sous contrôle viral, et le mécanisme de « l'interférence » entre les phages P<sub>2</sub> et lambda.

Se fondant sur les méthodes qui permettent d'isoler le chromoïde d'*E. coli* à l'état condensé (technique Worcel) il a été possible d'obtenir une fraction contenant 1/3 du DNA viral virtuellement dépourvu d'ADN cellulaire. Cette fraction est fonctionnelle pour la réplication *in vitro* et sa formation dépend de l'expression du gène P de lambda, qui intervient, on le sait, dans l'initiation de la réplication.

Le mécanisme de la synthèse de  $\beta$ -galactosidase, lorsque l'opéron *lac* est situé immédiatement à gauche d'un prophage thermo-inductible a été analysé en détail. L'opéron est transcrit selon deux *modes*. Les vagues de transcription issues de promoteurs viraux engendrent des RNAs de haut PM qui portent la séquence du gène *z*. Néanmoins cette dernière n'est pas traduite. Lorsque l'AMP cyclique est présent on assiste par ailleurs — alors même que le répresseur *lac* est actif — à une série d'initiations (CRP dépendantes) au niveau du promoteur lactose. Ce deuxième « mode » engendre des messagers traductibles.

En ce qui concerne l'interférence entre les phages P<sub>2</sub> et lambda, il a pu être montré que la présence *simultanée* des deux phages arrête brutalement la synthèse des protéines de l'hôte, par suite d'une inactivation des ARN de transfert. Fait remarquable, les gènes O et P de lambda (qui normalement interviennent dans l'initiation de la synthèse du DNA viral) sont nécessaires pour que l'inactivation des ARN de transfert se manifeste.

C. — *Manipulations génétiques*

(P. KOURILSKY, O. MERCEREAU, F. BRÉGÈGÈRE, M. GOTTESMAN, D. GROS)

De nouveaux mutants de  $\lambda$  pouvant servir de vecteurs à des fragments de DNA eucaryotes et dont la propagation est placée sous contrainte génétique ont été préparés : l'un, isolé après digestion partielle du DNA avec l'enzyme *Bam* porte une délétion des gènes *cIII* à *int*. Après coupure par *Eco RI* il y a perte du fragment *lac* central qui peut être substitué par de l'ADN étranger ; l'autre ne comporte qu'un seul site de coupure par *Eco RI*, localisé dans le gène *red* et porte également une mutation *gam*<sup>-</sup> de sorte que l'insertion de matériel étranger rendra le phage *gam*<sup>-</sup>*red*<sup>-</sup>. Ainsi, le phage porteur d'une insertion pourra-t-il être sélectionné positivement sur un coli K 12 lysogène pour P2.

En ce qui concerne les premiers travaux sur l'intégration de séquences procaryotes ou eucaryotes dans lambda ou des plasmides, seules des expériences classées « bas » ou « zéro » risque par la Commission de contrôle ont été entreprises. Il convient de citer plus particulièrement :

a) l'intégration dans le génome de lambda de fractions de DNA purifiées de *Xenopus laevis* qui codent pour les ARN de transfert (travail réalisé en collaboration avec P. Tiollais et le Dr Clarkson de Zurich).

b) l'intégration dans le plasmide pCR1 (construit par le Dr Carbon aux U.S.A.) d'une partie de la séquence des gènes globine du lapin. Le DNA du plasmide (kanamycine résistant) est ouvert par *Eco RI*, allongé avec de l'oligo dC à l'aide de deoxynucleotidyl terminal transférase. Par ailleurs, le messenger globine purifié est recopié avec la transcriptase inverse ; après élimination du RNA un deuxième brin de DNA est synthétisé et le double brin ainsi obtenu est allongé avec de l'oligo dG. Le plasmide et le DNA globine sont incubés en conditions permettant la soudure des extrémités homopolymériques. Après transfection et isolement du plasmide « hybride » on a notamment pu isoler un clone porteur d'un plasmide (pCRI $\beta$ GI) qui porte 200 nucléotides du gène codant pour la chaîne  $\beta$  de la globine ; les autres plasmides sont à l'étude (Travail réalisé avec B. Mach et F. Rougeon).

II. — *Recherches sur la chromatine des eucaryotes*

(M. JACQUET, B. ROBERT, F. GROS)

Une des préoccupations de ce laboratoire est l'étude des facteurs intervenant dans la restriction des potentialités d'expression génétique au niveau de la chromatine. De très nombreux travaux ont en effet établi que la

chromatine est une matrice beaucoup moins efficace pour les transcriptases animales ou bactériennes que ne l'est le DNA déprotéinisé. En revanche, les produits de transcription qui en résultent incluent les mêmes séquences spécifiques — et sensiblement dans les mêmes proportions — que celles correspondant aux messagers formés par la cellule d'origine (J. Paul et Gilmour, Felsenfeld). Par ailleurs, diverses expériences tendent à montrer que les protéines nucléaires « acides » (non histones) sont responsables de la sélectivité de transcription ainsi manifestée.

Nous avons mis au point une technique de sédimentation isopycnique en gradient de métrizamide qui permet de séparer commodément les complexes DNA-histones, ou DNA histones-protéines acides, des éléments non engagés du complexe et avons amorcé une étude comparative des aptitudes que possèdent ces complexes à servir de matrices à la RNA polymérase B. Cette approche devrait rendre possible une analyse des effets stimulateurs et régulateurs des protéines acides.

Nous étudions par ailleurs la transcription de séquences génétiques « non répétées » et le rôle des protéines acides en tant qu'éléments régulateurs du taux de transcription. Deux systèmes sont utilisés : d'une part, la chromatine de fibroblastes transformées par le virus du polyome (les séquences virales étant décelées par hybridation avec le DNA du virus), d'autre part, la chromatine provenant de la moelle de lapin anémié (en utilisant le plasmide pCRI $\beta$ GI comme détecteur du messenger globine).

### III. — *Différenciation cellulaire — Recherches sur la myogénèse*

(M. BUCKINGHAM, D. CAPUT, R. WHALEN, J. MERLIE, J.C. LELONG, W. WRIGHT, G. BUTLER-BROCCONE, A. COHEN, F. GROS)

Nous poursuivons activement nos recherches sur les facteurs de régulation de la myogénèse en système de cultures primaires ou à « développement continu ».

Nous avons montré que les myoblastes précurseurs, indifférenciés, synthétisent en abondance le messenger 26 S de la myosine, qu'ils ne traduisent qu'à des phases plus tardives du développement, généralement en début d'apparition des premiers myotubes. L'étude de la longueur des séquences de poly A 3'OH terminales des messagers formés chez les myoblastes et les myotubes a montré qu'un changement dans le métabolisme de ces séquences particulières n'est pas responsable des régulations de caractère post-transcriptionnel intéressant les RNA messagers pendant la myogénèse. Une analyse détaillée des propriétés comparatives des ribonucléoprotéines



libres (particules RNP cytoplasmiques) au sein desquelles les messagers se trouvent engagés, soit au stade précoce du développement (myoblastes) soit en fin de différenciation indiquent que des réarrangements profonds apparaissent au niveau des protéines *associées* aux RNA messagers. La nature de ces changements est en cours d'étude par électrophorèse bidimensionnelle.

Des systèmes acellulaires purifiés ont été mis au point qui permettent de traduire avec fidélité les principales protéines — sarcométriques ou non — qui sont synthétisées dans la cellule musculaire. Nous espérons tirer parti de ce système *in vitro* pour préciser certaines des étapes de régulation en cause dans la myogénèse terminale.

Un premier succès a été enregistré dans la purification du messenger spécifique de l'actine, dont la traduction *in vitro* a lieu avec une grande efficacité. Le DNA complémentaire de ce messenger (cDNA) a été préparé. Son emploi devrait permettre de préciser le nombre de gènes « actine » par cellule haploïde et de doser avec précision le nombre de copies transcrits pendant la myogénèse.

Une observation très importante rendue possible par la combinaison des techniques d'électrofocalisation et d'électrophorèse est que le myoblaste indifférencié synthétise 3 types d'actines, a, b, c. Les espèces a et b sont prépondérantes. En revanche, chez le myotube, c'est l'espèce c qui de loin domine. Les espèces a et b des myoblastes paraissent identiques aux « actines » de cellules non myogéniques. La différenciation myogénique doit donc s'accompagner soit d'une modification « post-traductionnelle » de certaines actines ubiquitaires, soit, ce qui est plus vraisemblable, de l'activation de gènes pour des isozymes particuliers.

Enfin, nos études sur le récepteur cholinergique de myoblaste de mammifère (veau fœtal) ont été poursuivies avec le groupe de J.P. Changeux. Une purification poussée de la protéine a été réalisée par chromatographie sur colonne d'affinité (neurotoxine). Il a été démontré que la transition myoblaste → myotube s'accompagne d'une très forte *néosynthèse* de récepteur dont la durée de vie est comprise entre 16 et 20 heures. Des études sont en cours pour analyser l'effet de diverses altérations physiologiques (excitations électriques, coculture nerf-muscle) sur le taux de synthèse et la stabilité du récepteur.

EQUIPE DU COLLÈGE DE FRANCE

*Recherches sur la différenciation des neuroblastomes murins*

A. — *Aspects cellulaires*

1. *Etude immunologique des composants de surface*

(Y. NETTER, A. KOULAKOFF-MORET, M. HOUDOT)

Des déterminants situés à la surface des cellules sont vraisemblablement impliqués dans les processus de reconnaissance cellulaire conduisant à la morphogenèse à des stades précoces du développement. L'utilisation de tissu nerveux comme matériel de départ pose des problèmes pratiques à cause de la grande hétérogénéité des types cellulaires, des difficultés d'identification des cellules dissociées, de leur viabilité détériorée et des faibles rendements, surtout quand il s'agit de stades embryonnaires précoces. Ceci explique l'intérêt qui s'attache aux lignées de cellules tumorales primitives ainsi qu'aux formes différenciées qui en dérivent. C'est ainsi qu'un nombre d'antigènes de surface caractéristiques aux cellules gliales et neuronales ont été déterminés (Schachner, Fields et coll.).

Nos objectifs d'étude effectuée sur les cellules clonées de neuroblastome C-1300 de souris étaient :

- L'évolution des antigènes de surface au cours de la transformation, en culture, de cellules blastiques en cellules neuronales.
- Une analyse comparative de ces antigènes dans des clones ayant des phénotypes morphologiques et/ou biochimiques différents.
- L'examen de l'existence d'une communauté antigénique avec des cellules d'origine tissulaire analogue, de la même ou d'autres espèces.
- La recherche des antigènes viraux.

Des xénoanticorps et des isoanticorps, dirigés contre des antigènes de surface de cellules de neuroblastome, ont été engendrés chez des lapins et des souris isogéniques. Les techniques principales utilisées étaient : la cytotoxicité en présence de complément, l'absorption quantitative et l'immunofluorescence indirecte.

Les résultats principaux de cette étude sont les suivants :

1°) Les cellules blastiques sont peu immunogéniques par rapport aux cellules différenciées à la fois dans le système xénogénique et isogénique. L'injection de cellules non différenciées à des souris n'a pas abouti à la

production d'anticorps cytotoxiques décelables et en immunofluorescence, seul un très faible marquage a été observé ; chez les lapins la quasi-totalité de l'activité semble résider dans les anticorps anti-espèce. Par contre, des titres adéquats des anticorps spécifiques ont été obtenus chez les deux espèces, immunisées avec des cellules différenciées. Des images en immunofluorescence ont permis de constater une densité des antigènes beaucoup plus grande sur les cellules différenciées que sur leur contrepartie blastique.

2° Les anticorps produits contre les cellules différenciées réagissent fortement avec les cellules blastiques. Des absorptions et examens réciproques indiquent l'existence de deux types d'antigènes de surface présents sur les deux formes de cellules, mais en quantité différente.

3° L'absorption par le cerveau de souris adulte élimine 80-90 % de l'activité de l'anti-sérum de lapin, mais est sans effet sur les anticorps de souris.

4° Des clones phénotypiquement différents ont des déterminants antigéniques communs mais avec des différences quantitatives.

5° Aucune réactivité croisée n'a pu être décelée avec un neuroblastome humain, un gliome de rat ou un mélanome de hamster.

6° Une forte parenté antigénique avec un gliome de souris (chimiquement induit) a été mise en évidence avec les anticorps de souris et de lapin.

7° La recherche des antigènes viraux nous a permis de constater l'absence de l'antigène type Moloney sur nos clones. Par contre, certains parmi eux, mais pas tous, expriment l'antigène Gross. Tandis qu'une partie des anticorps de lapin possèdent l'activité anti-Gross, les anticorps de souris en sont totalement dépourvus.

8° Des résultats préliminaires indiquent que tout au moins une partie de l'activité de nos antisérums est dirigée contre des déterminants antigéniques embryonnaires.

## 2. Biosynthèse et libération de l'acétylcholine

(A. KATO, P. LEFRESNE, Y. NETTER, J.P. TERNAUX, J.C. BEAUJOUAN, J. GLOWINSKI, F. GROS)

Dans ce travail, mené en collaboration étroite avec le groupe du Docteur Glowinski, nous nous sommes attachés à préciser trois aspects complémentaires du métabolisme de l'acétylcholine : a) l'origine métabolique de la copule acétyle. b) les mécanismes de transport de l'acétate et de la choline exogène. c) la libération de l'acétylcholine.

Il est connu que dans le système nerveux central le glucose sert de précurseur privilégié à la formation du radical acétyle de l'acétylcholine tan-

dis que ce radical tire son origine de l'acétate exogène dans le cas des cellules du système nerveux périphérique. Utilisant des précurseurs radioactifs à haute activité spécifique et déterminant la radioactivité de l'acétylcholine néosynthétisée dans des populations de neuroblastomes de type NS20 et C-15, nous avons pu montrer que les deux voies métaboliques (utilisant soit le glucose soit l'acétate comme précurseur) sont mises en œuvre dans la genèse du radical acétyle.

Même en présence d'une concentration exogène élevée de glucose (5 mM) qui correspond au niveau physiologique du flux sanguin on observe que l'acétate  $C^{14}$  est efficacement incorporé dans l'acétylcholine. Ce résultat permet d'avancer l'hypothèse selon laquelle l'acétate dérivant de l'hydrolyse de l'acétylcholine libérée peut être physiologiquement utilisé dans la synthèse des neurotransmetteurs. Les seuls systèmes neuronaux qui, en dehors de ceux décrits ici, se sont avérés capables d'utiliser l'acétate comme précurseur, sont les jonctions neuromusculaires de rat (Dreyfus, 1975) et de homard (Cheng et Nakamura, 1970) ainsi que l'épithélium de la cornée (Fitzgerald et Cooper, 1967) et l'organe électrique de torpille (Morel, 1975). L'étude des processus de concentration active de la choline et de l'acétate a été menée parallèlement dans les clones cholinergiques de neuroblastomes déjà mentionnés, clones qui diffèrent notamment par leur activité choline acétyltransférase. Deux modes de transport intracellulaire sont observés pour la choline : l'un est un processus de diffusion passive, l'autre fait intervenir un mécanisme de transport actif à haute affinité. L'addition de choline (0,2 à 1 mM) stimule de façon très marquante le processus de transport actif de l'acétate. Cette stimulation marquée ne s'observe que si l'on s'adresse à un clone cholinergique tel que NS 20, mais pas chez un clone adrénérgique (NIE-115) ou neutre (C-122). Inversement l'acétate n'a pas d'effet sur le transport de la choline. Ce résultat pourrait suggérer des relations topologiques étroites entre les « perméases » spécifiques des deux ligands.

Enfin, nous avons pu montrer par stimulation électrique appliquée à des suspensions de neuroblastomes en phase mitotique qu'une proportion importante de l'acétylcholine intracellulaire est libérée dans le milieu. Dans les expériences ainsi réalisées les cellules en suspension étaient stimulées 3 fois pour une période d'une seconde (5 mA, 20 Hz). La présence d'ions  $K^+$  (30 à 50 mM) ne cause par contre aucune libération du neurotransmetteur. Ces résultats tendraient à suggérer que les neuroblastomes murins, bien qu'incapables de former des synapses, possèdent une capacité quasi normale à libérer le neurotransmetteur. De plus l'acétylcholine peut être considérée comme un marqueur fiable des phénotypes cholinergiques puisqu'il apparait que l'acétylcholine est stockée, synthétisée et libérée dans les clones cholinergiques indifférenciés.

## B. — *Aspects moléculaires*

### 1. *Mécanismes de transcription*

(B. CROIZAT, F. BERTHELOT, A. NGUYEN THI TOT)

Une analyse systématique des messagers riches en séquences poly A terminales a été entreprise dans le but, d'une part, d'établir un répertoire des principales espèces transcrites dans une lignée neurogénique, et de comparer, d'autre part, les familles de RNA messagers synthétisés avant et après la formation des neurites. Les résultats les plus saillants de cette étude sont les suivants :

1°) Les RNA messagers cytoplasmiques riches en poly A dont on peut déceler la synthèse après un marquage relativement bref (6 h.) de populations de neuroblastomes indifférenciés (souche NE 115) présentent une grande polydispersité et se distribuent, en gradient de saccharose, en une série de sous-fractions sédimentant entre 16 S et 32 S.

2°) Parmi les messagers ainsi caractérisés on peut en distinguer 3 groupes qui diffèrent d'après leurs propriétés métaboliques : a) un groupe à renouvellement rapide avec des constantes de sédimentation de 16 S, 22-23 S et 26 S. Ces messagers sont décelables dans le cytoplasme après un marquage très bref à l'uridine tritiée (30 min) ; b) un groupe à taux de renouvellement moyen comprenant les espèces à 19-20 S et 30 S ainsi que du matériel polydisperse sédimentant plus vite que le 30 S. Ces messagers ne sont marqués que faiblement après 30 min. mais se présentent comme des sous-fractions bien caractérisées après 6 h. ; c) un groupe de messenger à renouvellement lent. Les espèces qui figurent dans ce groupe se marquent peu, même après 6 heures, mais se décèlent clairement après que le RNA cytoplasmique total ait été fractionné sur gradient et que chacune des fractions ait été hybridée avec du poly U tritié puis traitée par la ribonucléase  $S_1$  de manière à ne laisser subsister que les hybrides poly A-poly U.

3°) On ne décèle que fort peu de différence dans les propriétés hydrodynamiques des RNA messagers cytoplasmiques totaux ou dans ceux extraits des polysomes lorsque l'on compare des neuroblastomes cultivés en suspension jusqu'en fin de phase exponentielle, ou des neuroblastomes ayant développé des neurites après transfert dans un milieu sans sérum.

En d'autres termes, tout se passe en première approximation comme si la différenciation morphologique des neuroblastomes n'avait pour corollaire que des changements discrets dans le programme de transcription.

4°) Une différence importante paraît néanmoins démarquer assez nettement les deux états de développement du neuroblastome : dans les cellules « indifférenciées » en suspension, la fraction 16 S est activement transcrite. En revanche, dans les cellules différenciées, après deux jours en milieu

dépourvu de sérum, l'espèce 16 S cesse d'être décelable par marquage à l'uridine tritiée, tandis qu'elle l'est par hybridation avec le poly U tritié. Tout semble donc indiquer que le RNA 16 S — qui pourrait coder pour les chaînes de tubuline — cesse d'être transcrit au cours de la différenciation et devient métaboliquement stable.

## 2. Etudes sur la traduction

(L. LEGAULT, C. VIMARD, A. NGUYEN THI TOT, Y. ZEITOUN)

On a eu recours ici à deux voies d'approche pour étudier la synthèse des protéines et sa régulation chez le neuroblastome. La première est une voie d'approche globale. Il s'agit essentiellement d'établir un répertoire des principales classes de polypeptides synthétisés dans la cellule de neuroblastome soit au cours de sa phase de division (état indifférencié) soit au cours de la phase de formation de neurites. Les principaux polypeptides néoformés sont identifiés par marquage des cellules à l'aide de méthionine  $S^{35}$ , et les extraits cytoplasmiques débarrassés de membranes sont déposés sur des gels de polyacrylamide et soumis à une électrophorèse unidimensionnelle en conditions dénaturante (présence de SDS). On révèle les bandes protéiques par autoradiographie. Cette technique a un pouvoir de résolution relativement faible. Elle permet de constater que la transition des neuroblastomes arrondis et indifférenciés vers les formes à neurites ne s'accompagne pas de changements importants dans les principaux types de protéines synthétisées, résultat en accord avec les observations antérieures de Nirenberg. Plus récemment, en collaboration avec R. Whalen (Institut Pasteur), nous avons amorcé une étude comparative des spectres de protéines par la technique d'électrophorèse en double diffusion selon O'Farrell (combinaison d'électrofocalisation en urée entre pH 5.0 et 7.0 et d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS). Les premiers résultats sont encourageants en ce qu'ils permettent de constater l'existence de certaines différences entre extraits de neuroblastomes « en suspension » ou après formation de neurites. Ces différences, qui demeurent faibles, cependant, devront être précisées.

Ayant établi les spectres des protéines majoritaires dans les cellules de neuroblastome, il nous a été possible de démontrer qu'une préparation de messagers cytoplasmiques riches en poly A et provenant de ces cellules était capable de diriger dans un système acellulaire (germe de blé) la synthèse de protéines très voisines par leurs propriétés électrophorétiques de celles formées *in vivo*. Un tel système devrait s'avérer précieux ultérieurement pour analyser les types de régulation pouvant intéresser l'étape de traduction.

Une seconde voie d'approche, plus spécifique, consiste dans l'étude au cours de la différenciation des neuroblastomes d'une espèce protéique défi-

nie, dans le but de déterminer quels sont les facteurs qui peuvent en moduler le taux de synthèse.

Des expériences ont été entreprises au niveau de la biosynthèse de la tubuline, constituant majeur des neuroblastomes. La protéine a été purifiée à partir de cerveaux de rat, et l'étude de sa polymérisation a été amorcée. Il est envisagé de préparer un anticorps spécifique qui permette plus aisément de suivre les changements dans le niveau et dans le taux de synthèse de cette protéine.

Notre choix s'est également porté sur une autre protéine, connue sous le nom de 14-3-2. Il s'agit en réalité d'une forme isozymique de l'énolase, forme caractéristique des cellules nerveuses. Mettant à profit l'existence d'un anticorps spécifique, qui nous a été aimablement fourni par le Professeur Fasella, de l'Université de Rome, nous avons pu démontrer que la protéine 14-3-2 est présente dans divers clones de neuroblastomes de souris, ainsi que dans des cellules d'un clone hybride neuroblastome — cellule de ganglion sympathique cervical (hybride de L. Green, mais qu'elle est absente des cellules hépatiques de souris. En utilisant le test de la fixation du complément, il a été possible d'étudier les changements quantitatifs dans la teneur en 14-3-2 au cours de la différenciation et de démontrer que la teneur en cette protéine s'accroît de façon très substantielle dans les premières heures qui précèdent la formation des neurites. Il devrait donc être possible d'analyser désormais les mécanismes responsables de la régulation du gène codant pour cette protéine spécifique.

### 3. *Polymorphisme de la cholinestérase*

(C. VIMARD, Y. NETTER, C. JEANTET)

L'« induction » de la capacité à former des neurites qui accompagne le transfert de neuroblastomes cultivés en suspension, sur milieu dépourvu de sérum, dans des conditions de cultures en monocouches sur support solide, s'accompagne d'un accroissement important du taux de synthèse de cholinestérase. Nous avons montré que cet accroissement a pour corollaire un changement important dans les propriétés hydrodynamiques de la cholinestérase extraite des membranes. On assiste en effet à une conversion d'une forme 6 S en forme 11 S. Cette « conversion » a lieu, quoique plus lentement, lorsqu'un inhibiteur de la synthèse des protéines (cycloheximide) est présent. Il ne semble pas que le simple passage des neuroblastomes de l'état de « divisions actives » à l'état post-mitotique suffise à expliquer les phénomènes observés. En effet, si l'on ajoute du butyrate de sodium à des cultures de neuroblastomes en suspension, on induit une importante synthèse de cholinestérase ; les divisions cessent mais l'on n'assiste pas au phénomène de transition de formes. On peut donc penser qu'un événement

lié à la différenciation — sans doute membranaire — des neuroblastomes est nécessaire à la conversion de la forme 6 S en forme 11 S. Toutefois il n'existe pas de coordination temporelle entre l'apparition de la forme 11 S et celle des neurites. De plus, au cours de la « dédifférenciation » morphologique (rétraction des neurites après addition de sérum) la forme 11 S persiste.

Des études sont en cours pour préciser les types de régulation mis en œuvre en utilisant un clone hybride de neuroblastome et de cellules de ganglion sympathique, chez lequel il a été montré que les transitions polymorphiques de la cholinestérase étaient nettement plus prononcées que chez le neuroblastome parental. (D. LAZAR et L. GREEN).

## ENZYMOLOGIE

Le groupe de recherche du C.N.R.S. n° 006 a poursuivi des travaux sur la structure et le mécanisme d'action des protéines enzymatiques et contractiles.

### I. — *Centre actif des enzymes, mécanisme de réaction, structure*

#### A. *Octopine deshydrogénase*

1) Les résultats des études cinétiques à l'état stationnaire et à l'état préstationnaire ont permis de proposer un modèle décrivant l'octopine deshydrogénase comme un enzyme « à mémoire » obéissant à un mécanisme séquentiel Bi Ter complété par l'existence de complexes abortifs. (A. OLOMUCKI, M.-O. DOUBLET).

2) Les résidus His de l'octopine deshydrogénase ont été titrés à l'aide de la résonance magnétique nucléaire. Quatre de ces résidus ont pu être titrés dans l'apoenzyme natif. Dans les complexes binaires E-NAD et E-ADP-ribose, deux His semblent être légèrement perturbées. Dans l'enzyme photooxydé dans les conditions où l'His essentielle est protégée, seul un de ces résidus est perturbé. Les études de l'enzyme photooxydé inactif et des complexes binaires et ternaires qui sont en cours doivent permettre d'identifier l'His essentielle à la catalyse. (A. OLOMUCKI, D.B. PHO, M. ROUX, F. THOMÉ et C. HUC).

#### B. *ATP-phosphotransférases*

##### 1) *3-Phosphoglycérate kinase de levure*

Les propriétés physicochimiques de la 3-phosphoglycérate kinase iodée au niveau de sa tyrosine active ont été étudiées et l'implication de ce résidu



au niveau de la fixation du 3-phosphoglycérate établie. (C. ROUSTAN, A. FATTOUM, L.-A. PRADEL).

Les peptides obtenus après hydrolyse de l'enzyme au BrCN ont été purifiés, analysés, les peptides N et C terminaux caractérisés. L'enchaînement de ces peptides est en cours d'étude. (A. FATTOUM, C. ROUSTAN, L.-A. PRADEL).

La localisation dans le peptide C terminal du résidu glutamyl essentiel à l'activité catalytique a été établie. (G. DESVAGES, C. ROUSTAN, L.-A. PRADEL).

## 2) *Hexokinase de levure*

L'implication d'un seul résidu carboxyle essentiel à l'activité de l'hexokinase de levure a été confirmée. La caractérisation chimique de ce résidu est entreprise. Des changements conformationnels de l'enzyme sous l'action des substrats ont été mis en évidence au cours de ce travail (D.B. PHO, C. ROUSTAN, L.-A. PRADEL).

## 3) *Arginine kinase*

a - Structure primaire de l'arginine kinase monomérique de homard.

Les séquences N et C terminales, l'ordre des fragments BrCN ont été déterminés. (F. REGNOUF, R. KASSAB). La mise en place de 200 acides aminés a été réalisée. (Faculté de Médecine de Lille : Professeur BISERTE, B. DEBUIRE, K.K. HAN).

b - Structure tertiaire. Etude aux R.X.

Les paramètres cristallins de l'enzyme native ont été déterminés. Des cristaux isomorphes infiltrés de métaux lourds sont étudiés. (Institut Pasteur - Université Val de Marne : J. JANIN, M. GADET, Prof. RENAUD). L'enzyme a été également cocrystallisée en présence de ses substrats. (C. DUBORD, L.-A. PRADEL, N. v. THOAI).

c - Etude RMN (250 MHz) des histidines de l'arginine kinase.

8 histidines ont été titrées sur l'enzyme native. L'une d'elles, dont le pK augmente de 0,7 en présence des complexes contenant l'ADP, disparaît du spectre quand on modifie l'enzyme au moyen de pyrocarbonate d'éthyle. Cette modification chimique affecte 1 histidine avec perte totale de l'activité enzymatique. L'étude de complexes enzyme-nucléotide est effectuée parallèlement en RMN de P<sup>31</sup>. (D.B. PHO, R. KASSAB, L.-A. PRADEL, en collaboration avec M. ROUX du Centre d'études nucléaires de Saclay).

## II. — *Protéines contractiles*

1) Les cinétiques de l'interaction coopérative d'un réactif analogue de l'ATP, synthétisé au laboratoire, ont été étudiées sur la myosine et sur le sous-fragment SF<sub>1</sub> de muscle rapide de lapin. L'interdépendance du site de réaction de l'analogue avec celui de l'ATP suggère l'existence d'un site régulateur. (E. DER TERROSSIAN, D. MORNET, L.-A. PRADEL, R. KASSAB).

2) La constance de vitesse de formation du complexe myosine-ADP-P a été déterminée sur divers types de muscles. Il a été trouvé qu'il y a une relation entre la vitesse intrinsèque de raccourcissement du muscle et la vitesse de rupture de l'ATP, laquelle se produit dans l'étape préstationnaire de la réaction actomyosine ATPase. (G. LACOMBE, N. V. THIEM).

3) Des études sur les actines isolées de muscle strié adulte, fœtal et tumoral ont été entreprises sous l'angle physico-chimique. (C. ORIOL et F. LANDON).

4) L'étude du rôle des protéines contractiles dans le fonctionnement des plaquettes sanguines a été entreprise. Cette étude a débuté par la préparation de l'actine plaquettaire afin de préciser sa répartition dans la cellule. (A. OLOMUCKI, F. THOMÉ et C. HUC).

## *CHIMIE ORGANIQUE BIOLOGIQUE*

L'équipe dirigée par M. M. OLOMUCKI, sous-directeur du laboratoire, a poursuivi des recherches sur divers agents de modification chimique des macromolécules biologiques.

Les propriétés du groupement chloro-4 dinitro-3,5 phényle, en particulier la substitution du chlore par différents nucléophiles et les caractéristiques spectrales et la stabilité des produits ainsi obtenus, ont été étudiées. Il s'est avéré que, malgré certaines différences de propriétés, les chlorures aromatiques o,o'-dinitrés peuvent être utilisés pour l'étude chimique des protéines au même titre que les halogénures o,p-dinitrés couramment employés dans ce but, tout en présentant sur ces derniers l'avantage de constituer un meilleur point de départ pour la synthèse de réactifs bifonctionnels comprenant ce fragment chromogène. Ainsi, on a synthétisé deux nouvelles molécules contenant ce dernier, attaché à un groupement maléimide ou un radical mercu-riphényle. Les deux nouveaux réactifs bifonctionnels ainsi obtenus ont été testés par différentes réactions modèles avec de petites molécules et avec des protéines. Dans l'alcool-deshydrogénase de levure, chacun de ces composés substitue 4 SH, mais deux d'entre eux seulement sont ensuite pontés

avec des groupements  $\text{NH}_2$ . L'étude de ces réactions a montré que, contrairement aux indications de la littérature (obtenues à l'aide de réactifs bifonctionnels à structure très flexible, pouvant effectuer des pontages à des distances variables), cet enzyme tetramérique possède une symétrie  $D_2$ , ses sous-unités étant assemblées en un dimère de dimères. Ces résultats soulignent l'avantage de l'utilisation de réactifs à flexibilité limitée pour l'étude de la structure tertiaire et quaternaire des protéines.

On a également cherché à introduire dans la gamme des fonctions utilisables pour la modification des macromolécules biologiques, la triple liaison activée. Sur l'exemple de l'acide et ester chloro-4 butynoïque, on a montré qu'un tel groupement acétylénique peut réagir dans des conditions biologiques avec différents nucléophiles présents dans les protéines. La facilité de ces réactions et la stabilité des produits d'addition obtenus dépendent de la nature du nucléophile et des conditions expérimentales (pH). Le blocage des groupements  $\text{NH}_2$  s'est montré particulièrement réversible. Dans le cas de la ribonucléase, les résidus essentiels Lys et His ont ainsi été réversiblement pontés par le chloro-4 butynoate de méthyle.

Des recherches sur la synthèse de divers types de réactifs photoactivables, destinés aux pontages des macromolécules ribosomales, ont été poursuivies.

## ENDOCRINOLOGIE

Le groupe de recherche dirigé par le Professeur R. MICHEL, Endocrinologie, Université René-Descartes, a poursuivi ses travaux sur les effets d'analogues structuraux des hormones thyroïdiennes, sur la fixation cellulaire de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine et sur l'influence de l'hormone de croissance et des hormones thyroïdiennes sur les propriétés mitochondriales.

### A. — Effets d'analogues structuraux des hormones thyroïdiennes

Les effets *in vivo* et *in vitro* de la 3,5-diiodo-3'-isopropyl-L-thyronine ( $\text{IPT}_2$ ) et de l' $\alpha$  méthyl-DL-thyroxine ( $\text{MT}_4$ ) qui sont des analogues structuraux des hormones thyroïdiennes, ont été comparés à ceux provoqués par la 3,5,3-triiodo-L-thyronine ( $\text{T}_3$ ) et la L-thyroxine ( $\text{T}_4$ ).

On a trouvé que les deux composés synthétiques possèdent des effets inhibiteurs semblables à ceux observés avec  $\text{T}_3$  et  $\text{T}_4$  vis-à-vis des deshydrogénases glutamique, isocitrique et éthanonique. Ils découplent les phosphorylations des oxydations des mitochondries isolées et inhibent le transport des électrons.

Chez l'animal thyroïdectomisé on constate qu'un traitement prolongé avec IPT<sub>2</sub> rétablit le métabolisme de base ainsi que l'activité de l' $\alpha$  glycérophosphate deshydrogénase, tandis que MT<sub>4</sub> ne possède qu'un effet mineur. Cependant, l'activité de la glutamate deshydrogénase mitochondriale hépatique est ramenée à la normale comme avec T<sub>4</sub>.

On a montré que la tyrosine hydroxylase surrénalienne dépend de l'état thyroïdien; diminuée après thyroïdectomie, son activité est ramenée à la normale par T<sub>4</sub> et fortement augmentée après traitement par IPT<sub>2</sub>.

#### 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 hépatocytes isolés de rats normaux et thyroïdectomisés. La respiration des hépatocytes 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 hépatocytes 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<sub>3</sub> est de  $0,88 \times 10^{12} \times M^{-1}$ . Le nombre des sites est faible puisqu'on n'a pu en caractériser qu'environ 130 par cellule.

#### C. — Effets de l'hormone de croissance et de T<sub>3</sub> sur la mitochondrie

L'activité de plusieurs enzymes marqueuses des divers compartiments des mitochondries hépatiques est déterminée chez le rat hypophysectomisé-thyroïdectomisé et chez la souris naine (dw/dw).

Les activités de la cynurénine hydroxylase et de la NADH cytochrome c réductase insensible à la roténone localisée dans la membrane externe sont augmentées chez le rat hypophysectomisé-thyroïdectomisé et abaissées chez la souris dwarf. L'injection de T<sub>3</sub> à ces deux types d'animaux se traduit par une diminution d'activité de ces enzymes, tandis que le traitement par GH, qui est sans effet chez l'animal opéré, les restaure en partie chez la souris.

Chez le rat hormonoprive et la souris naine, l'activité des enzymes impliquées dans les réactions d'oxydophosphorylation est abaissée par rapport à celle des animaux normaux. Une diminution de l'activité des réductases est responsable de cet effet chez le rat, alors qu'une cytochrome oxydase moins active est le facteur déterminant chez la souris. L'administration de T<sub>3</sub> stimule l'activité des réductases du rat et de la souris et, comme la GH, rétablit celle de la cytochrome oxydase chez la souris naine.

Les résultats obtenus chez l'animal hypophysectomisé-thyroïdectomisé étant comparables à ceux précédemment trouvés chez le rat thyroïdoprive, il apparaît que la sécrétion thyroïdienne exerce une influence prépondérante sur les propriétés des mitochondries.

#### COLLOQUES, MISSIONS DIVERSES

M. François GROS a été invité à faire un rapport au Congrès international de l'I.U.P.A.C., à Téhéran, qui a porté sur la structure de la chromatine et l'expression génétique des eucaryotes.

Il a également été invité par l'Université de Cleveland à donner une conférence générale (Frontier Lectures) sur la différenciation.

Il a participé à une mission scientifique à Lisbonne sur l'invitation de la Fondation Gulbenkian.

Il a organisé avec M. F. Jacob le symposium sur la différenciation dans le cadre du 10th International Meeting of the FEBS (Paris).

Il a été invité par l'Université d'Upsala et l'Institut Karolinska de Stockholm à donner deux conférences sur la myogenèse *in vitro*.

Il a donné une conférence aux Rencontres de Pasteur.

M. M. OLOMUCKI a été invité à faire une conférence à l'Université de Berkeley (U.S.A.) et deux autres au Colloque sur les méthodes physico-chimiques en biochimie à Cortona (Italie). Il a également participé à la Rencontre 1975 sur les méthodes physico-chimiques appliquées à la biologie (Institut Pasteur, Paris).

M<sup>me</sup> C. ORIOL et M<sup>lle</sup> M.-F. LANDON ont participé aux Rencontres de Pasteur (novembre 1975), où elles ont fait une communication.

M<sup>me</sup> C. ORIOL a donné une conférence au C.E.A., Saclay (mars 1975).

#### THÈSE, DIPLOME

M<sup>lle</sup> M.-O. DOUBLET a soutenu une thèse de doctorat 3<sup>e</sup> cycle (Université Paris-Sud) intitulée : *Etude du mécanisme d'action de l'octopine déshydrogénase de Pecten maximus. Proposition d'un modèle cinétique.*

M. D. MORNET a obtenu un DEA de Biochimie (Université Paris VI) intitulé : *Synthèse de l'isopropylidène 2'3' adénosine (2,3 dibromohydrogènesuccinate)5' et étude cinétique de son effet inhibiteur sur la myosine de muscle de lapin.*

M. J.-P. LAUTIE a soutenu une thèse de doctorat 3<sup>e</sup> cycle (Paris VI), intitulée : *Etude des propriétés des maléimides et isomaléimides halogénées et de leur application en tant que réactifs bifonctionnels des protéines.*

#### PUBLICATIONS

M.E. BUCKINGHAM et F. GROS, *The use of metrizamide to separate cytoplasmic RNP particles in muscle cell cultures : a method for the isolation of messenger RNA independent of its poly A content (FEBS Letters, 1975, 53, p. 355-359).*

F. GROS et M. CRÉPIN, *Transcription and its regulation at the ribosomal level in prokaryotic systems (Molecular Biology of Nucleocytoplasmic Relationships, Puiseux-Dao, éd., Elsevier, Amsterdam, p. 5-20).*

J. P. MERLIE, A. SOBEL, J.P. CHANGEUX et F. GROS, *Synthesis of acetylcholine receptor during differentiation of cultured embryonic muscle cells (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1975, 72, p. 4028-4032).*

C. LIN SU, J.M. MERLIE et H. GOLDFINE, *Rapid cessation of phospholipid synthesis in a temperature sensitive fructose 1,6-diphosphate aldolase mutants of E. coli (J. Bacteriol., 1975, 122, p. 565-569).*

M.E. BUCKINGHAM, S. GOTO, R.G. WHALEN et F. GROS, *Messenger stabilization and activation during myogenesis (Proceedings of the 10th FEBS Meeting, Paris, 1975, Y. Raoul, éd., North Holland, 38, p. 325-336).*

J. YANIV et F. GROS, *Characterization of a novel, low molecular weight DNA-binding protein from E. coli (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1975, 72, p. 3428-3432).*

K.A. MARCKER, G.E. BLAIR, H.H.M. DAHL et J.C. LELONG, *Aspects of eukaryotic protein synthesis (Proceedings of the 10th FEBS Meeting, Paris, 1975, Y. Raoul, éd., North Holland, 39, p. 297-307).*

F. ROUGEON, P. KOURILSKY et B. MACH, *Insertion of a rabbit  $\beta$ -globin gene sequence into an E. coli plasmid (Nucleic acid research, 1975, 2, p. 283-298).*

Y. GRONER, G. MONROY, M. JACQUET et G. HURWITZ, *Chromatin as a template for RNA synthesis in vitro* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 1975, 72, p. 194-199).

J. THIBAUT, *Topologie du ribosome* (*La Recherche*, 1975, 6, p. 776-777).

A.C. KATO, P. LEFRESNE, Y.B. NETTER, J.P. TERNAUX, J.C. BEAUJOUAN, J. GLOWINSKI et F. GROS, *Synthesis and release of acetylcholine in cholinergic mouse neuroblastoma clones* (*Nature*, 1976, sous presse).

C. VIMARD, C. JEANTET, Y. NETTER et F. GROS, *Changes in the sedimentation properties of acetylcholinestérase during neuroblastoma differentiation* (*Biochimie*, 1976, 58, p. 473-478).

A. OLOMUCKI, F. THOMÉ-BEAU, J.-F. BIELLMANN et G. BRANLANT, *Study of coenzyme binding site of octopine dehydrogenase using analogues of NAD* (*Eur. J. Biochem.*, 1975, 56, p. 109-116, et *10th Internatl. Meeting of FEBS*, Paris, 1975, Abstr. 724).

M.-O. DOUBLET et A. OLOMUCKI, *Investigations of the kinetic mechanism of octopine dehydrogenase. 1. Steady state kinetics* (*Eur. J. Biochem.*, 1975, 59, p. 175-183).

M.-O. DOUBLET, A. OLOMUCKI, A. BAICI et P.-L. LUISI, *Investigations of the kinetic mechanism of octopine dehydrogenase. 2. Location of the rate-limiting step for enzyme turnover* (*Eur. J. Biochem.*, 1975, 59, p. 185-191).

C. HUC, A. OLOMUCKI et F. THOMÉ-BEAU, *Modification of the essential carboxyl group in octopine dehydrogenase* (*FEBS Lett.*, 1975, 60, p. 414-418, et *10th Internatl. Meeting of FEBS*, Paris, 1975, Abstr. 625).

M.-O. DOUBLET, A. OLOMUCKI, P.-L. LUISI et A. BAICI, *Mechanism of octopine dehydrogenase. Determination of the order of substrates binding and location of the rate limiting step* (*10th Internatl. Meeting of FEBS*, Paris, 1975, Abstr. 725).

A. FATTOUM, R. KASSAB et L.-A. PRADEL, *The tyrosyl residues in creatine kinase. Modification by iodine* (*Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 405, p. 324-339).

A. FATTOUM, R. KASSAB et F. REGNOUF, *Isolement du peptide à tyrosine essentielle de l'arginine kinase de homard* (*Biochimie*, 1975, 57, p. 859-863).

A. BREVET, Y. ZEITOUN et L.-A. PRADEL, *Comparative structural studies of the active site of ATP — guanidine phosphotransferases : the essential cysteine tryptic peptide of taurocyamine kinase from *Arenicola marina** (*Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 393, p. 1-9).

- A. FATTOUM, C. ROUSTAN, L.-A. PRADEL et N. v. THOAI, *Yeast 3-phosphoglycerate kinase : evidence for a single essential tyrosyl residue (10th Internat. Meeting of FEBS, Paris, 1975, Abstr. 618).*
- M. ROUX, L.-A. PRADEL, R. KASSAB, D.B. PHO et N. v. THOAI, *A study of the histidyl residues of arginine kinase using proton NMR and chemical modifications (10th Internat. Meeting of FEBS, Paris, 1975, Abstr. 629).*
- J. BERTHOU, C. RERAT, B. RERAT, A. GADET, R. FOURME, M. RENAUD, C. DUBORD, L.-A. PRADEL, C. ROUSTAN et N. v. THOAI, *Preliminary X-ray diffraction studies on lobster ATP-L-arginine phosphotransferase (J. Mol. Biol., 95, p. 331-333).*
- C. ROUSTAN, D.B. PHO et L.-A. PRADEL, *Yeast hexokinase : studies of the essential carboxyl groups (10th Internat. Meeting of FEBS, Paris, 1975, abstr. 623).*
- B. DEBUIRE, K.K. HAN, F. REGNOUF et R. KASSAB, *Partial primary structure of lobster arginine kinase (10th Internat. Meeting of FEBS, Paris, 1975, Abstr. 585).*
- M.-F. LANDON et C. ORIOL, *Native conformation of M-protein (Biochem. Biophys. Res. Comm., 1975, 62, p. 241-245, et 10th Internat. Meeting of FEBS, Paris, 1975, Abstr. 565).*
- C. ORIOL and R. ORIOL, *Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of Echinococcus granulosus (Am. J. Trop. Med. & Hyg., 1975, 24, p. 96-100).*
- M. ROUSSET, C. ORIOL, A. ZWEIBAUM, G. CHEVALIER, A.M. DALIX, E. DUSSAULX and R. ORIOL, *Purification 125 T labeling and immunochemical study of the canine secretory alloantigens (C.S.A.) (Transplantation Proc., 1975, sous presse).*
- F. BONNET et C. ORIOL, *Structural properties of actin in the thin filament (10th Internat. Meeting of FEBS, Paris, 1975, Abstr. 564).*
- J. DIOPOH et M. OLOMUCKI, *Halogenoimidoesters, New bifunctional protein reagents (10th Internat. Meeting of FEBS, Paris, 1975, Abstract 559).*
- S. COMBRISSE, J.-P. LAUTIÉ et M. OLOMUCKI, *Etude par la RMN du <sup>13</sup>C de quelques maléimides et isomaléimides et de leurs produits d'addition avec les thiols (Bull. Soc. Chim., 1975, p. 2769).*
- H. GOUDONNET, R. TRUCHOT et R. MICHEL, *Influence d'analogues structuraux de la triiodo-3,5,3-L-thyronine sur l'activité de la glutamate deshydrogénase et de l'isocitrate deshydrogénase mitochondriales hépatiques et cardiaques et de l'alcool deshydrogénase hépatique in vivo et in vitro (Biochem. Pharmacol., 1975, 24, p. 1679).*



H. GOUDONNET, B. CHAILLOT, R. TRUCHOT et R. MICHEL, *Caractères de l'inhibition de l'isocitrate et de l'alcool deshydrogénase par les analogues formique, acétique et propionique de la triiodo-3,5,3'-L-thyronine* (*Biochem. Pharmacol.*, 1975, 24, p. 1687).

J. BOUHNİK, O. MICHEL, D. FRANÇOIS, J.P. CLOT et R. MICHEL, *Effets de la thyroïdectomie du rat sur la structure et les fonctions des mitochondries des muscles squelettiques* (*Biochimie*, 1975, 57, p. 779).

M. BAUDRY, J.P. CLOT, J. BOUHNİK, O. MICHEL et R. MICHEL, *Thyroid hormone action on electrophoresis patterns of proteins of rat liver and muscle mitochondria* (*7th International Thyroid Conference*, Boston, juin 1975).

J.P. CLOT, M. BAUDRY et R. MICHEL, *Effects of thyroid and growth hormones on liver mitochondria of genetically dwarf mice and hypophysectomized rats* (*7th Annual Meeting European Thyroid Association*, Helsinki, juin 1976).

F.X. GALEN, *Mise en évidence de sites récepteurs spécifiques de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine sur les hépatocytes isolés de rat* (*Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1976, 170, n° 2).

N. ZENKER, R. TRUCHOT, H. GOUDONNET, B. CHAILLOT et R. MICHEL, *Isopropyl-diiodothyronine and methylthyroxine : comparison of their in vitro and in vivo effects with those of thyroid hormones* (*Biochem. Pharmacol.*, 1976, sous presse).