

## **Biochimie cellulaire**

M. François GROS, professeur

### *Etude de la différenciation somatique terminale*

#### II. - *La neurogenèse*

C'est dans le cadre d'une étude analytique des mécanismes de la différenciation cellulaire des organismes eucaryotiques que s'est à nouveau inscrit le cours que nous avons consacré, cette année, à la neurogenèse.

La neurobiologie connaît aujourd'hui un considérable essor dont il faut sans doute chercher l'origine dans l'intérêt que portent les neurophysiologistes et neuroanatomistes au système nerveux central, mais aussi dans les progrès de la neurochimie ainsi que de la biologie du neurone quant aux propriétés fondamentales et au fonctionnement de cet élément-clé des communications intercellulaires. L'ontogenèse des propriétés neurales dans les cellules des systèmes périphérique et central demeure, pour sa part, mal comprise. Comment un neurone acquiert-il sa morphologie propre, son aptitude à transmettre l'information électrotonique, à produire et libérer des médiateurs spécialisés ou à leur répondre ? Telles sont les questions que nous avons tenté d'aborder aux plans moléculaire et cellulaire.

L'étude biochimique de la différenciation d'une cellule neurale à partir de ses précurseurs blastiques a enregistré d'importants progrès grâce à la mise en œuvre des cultures de neuroblastes provenant de tumeurs spontanées de cellules viro-induites de l'hypothalamus ou de ganglions sympathiques au stade embryonnaire.

La première partie de notre cours a donné lieu à un rappel de certaines parmi les plus importantes caractéristiques des cellules nerveuses : nature et propriétés physiologiques des systèmes nerveux central et autonome, nature chimique et métabolisme des transmetteurs, nature des principaux agonistes ou antagonistes ; organisation cellulaire et subcellulaire du neurone, éléments

d'ultrastructure ; principes générateurs du potentiel d'action, hyperpolarisation liée aux flux ioniques ; conduction dans les fibres myélinisées ou sans myéline ; transports axoplasmiques ; transmission synaptique ou ephaptique etc. Le but recherché ici est d'introduire la sémantique et la description des marqueurs morphologiques, métaboliques ou physiologiques pouvant être utilisés dans l'étude de la neurogenèse.

La seconde partie de ce cours a été consacrée à une étude comparative des principaux types de neurones dont le développement peut être commodément analysé par la technique des cultures *in vitro*, un accent particulier étant mis sur les cellules de neuroblastomes. En 1963, plusieurs laboratoires ont, en effet, réussi à provoquer la différenciation morphologique de neuroblastomes murins (tumeur de la souris C 1300) ou humains. Ces cellules émanant de tumeurs spontanées de la crête neurale se développent à l'état de blastes plus ou moins arrondis et indifférenciés lorsqu'elles sont maintenues en suspension dans des milieux riches en sérum. L'enlèvement de sérum et l'étalement en monocouches sur support « solide » déclenchent en quelques jours l'apparition de prolongements neuritiques, plus ou moins longs et plus ou moins arborescents selon les souches et les conditions d'induction. Les neuroblastomes ainsi différenciés présentent des caractéristiques ultrastructurales (neurofilaments, neurotubules), une excitabilité électrique et des propriétés métaboliques caractéristiques des neurones matures. On distingue plusieurs phénotypes selon l'aptitude à synthétiser : la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme-clé dans la biosynthèse des catécholamines, ou la choline acétyl transférase (CAT), enzyme formateur d'acétylcholine, ces deux propriétés étant généralement exclusives mais pouvant parfois coexister ou faire défaut l'une et l'autre (clones dits « neutres »). Bon nombre de neuroblastomes murins ou humains ont été isolés à l'état de populations clonales et se prêtent ainsi à une étude précise de la neurogenèse.

Disposant de souches de neuroblastomes à génotypes variés, il est en effet possible d'analyser les modalités de l'« induction » de la neurogenèse sous des angles divers, qu'il s'agisse de la formation du tube neural, des propriétés d'excitabilité ou de la biosynthèse des enzymes-clés du métabolisme des transmetteurs (acétylcholine estérase, ou AChE, CAT, TH, enzymes respiratoires, adényl cyclases catécholamines ou ACh-dépendantes etc.). Un très grand nombre de substances chimiques ou d'agents physiques appelés « inducteurs » ont en effet la propriété de convertir les blastes indifférenciés et capables de se diviser en des cellules post-mitotiques présentant certaines ou la totalité des propriétés d'un neurone mature (à l'exclusion cependant de l'aptitude à former des synapses). Ces substances ou ces traitements reflètent une grande hétérogénéité de type : enlèvement du sérum, analogues chimiques de l'AMP cyclique non hydrolysables, inhibiteurs de la phos-

phodiesterase, butyrate de sodium, analogues de bases nucléiniques, inhibiteurs du cycle mitotique, ou agents connus par ailleurs comme inducteurs de l'érythropoïèse terminale : diméthyl sulfoxyde (DMSO) ou acétylène bis-acétamide etc.). On peut néanmoins classer ces agents ou ces traitements physicochimiques selon qu'ils interviennent aux stades *précoces* de la neurogenèse en augmentant la concentration intracellulaire en AMP cyclique et entraînent une synthèse accrue d'AChE sans affecter les autres paramètres de la différenciation, ou qu'ils induisent l'ensemble du processus ontogénique incluant les systèmes biosynthétiques des transmetteurs, la formation du tube neural et les propriétés d'excitabilité membranaire. Il est en outre possible d'interférer avec la morphopoïèse terminale (formation du tube neural) sans bloquer la différenciation « enzymatique » (enzymes du métabolisme des transmetteurs, principales déshydrogénases) en utilisant des substances inhibitrices de l'assemblage des microfilaments (cytochalasine) ou des microtubules (colcemide). L'élévation de la concentration intracellulaire en AMP cyclique, sans doute liée elle-même à des changements dans l'activité d'adényl-cyclases spécifiques, paraît, quoi qu'il en soit, constituer l'élément biochimique déclencheur de l'ensemble du processus neurogénique.

Si l'emploi des cultures de neuroblastomes permet de disséquer assez commodément certaines des phases de la neurogenèse terminale, ce système cellulaire ne saurait être assimilé à un modèle parfait du neurone normal. Cellule d'origine tumorale le neuroblastome est généralement aneuploïde ; il est porteur de nombreux antigènes viraux et, quoiqu'électriquement excitable et capable de libérer spécifiquement de l'acétylcholine en réponse à l'addition d'ions  $K^+$ , il est inapte à établir des contacts synaptiques avec d'autres cellules neurales ou musculaires. De plus certains de ses lipides membranaires et certains de ses isozymes respiratoires sont atypiques. Il est dépourvu de récepteurs pour le NGF (« nerve growth factor »).

Cette situation explique sans doute l'intensité des recherches visant à obtenir de meilleurs modèles de la neurogenèse. Bon nombre de systèmes aujourd'hui disponibles permettent ainsi d'approfondir certains des aspects importants de la différenciation neurale dont l'analyse serait difficile ou impossible en ayant recours aux neuroblastomes.

Ainsi les hybrides somatiques (synkaryons) obtenus par fusion cellulaire entre des neuroblastomes murins et des cellules L (L. Green, Chalazonitis) s'avèrent d'un intérêt tout particulier pour l'induction à un taux élevé de la TH et de l'AChE. Ils demeurent incapables toutefois de former des synapses fonctionnelles. Un espoir plus grand est placé dans l'emploi d'hybrides cellulaires entre neuroblastomes et gliomes (Nirenberg). Certains clones (en particulier le NG 108-15) présentent des propriétés tout à fait remarquables telles que la présence sur leur membrane externe de récepteurs aux « opiacés »

et la capacité d'établir des contacts synaptiques avec des myotubes émanant d'espèces très variées. L'existence de récepteurs spécifiques pour les analogues de la morphine a permis à Nirenberg et à ses collaborateurs d'analyser en détail l'effet des narcotiques sur l'activité des adényl-cyclases et devrait autoriser des recherches d'un grand intérêt dont l'objectif est l'isolement, la purification et l'étude des propriétés allostériques de ces récepteurs.

Un autre modèle d'un grand intérêt est celui du phéochromocytome. Les cellules de cette tumeur spontanée de la médullo-surrénale de rat répondent de façon spectaculaire à l'addition de NGF en formant de très longs neurites ainsi que par la synthèse de nombreux marqueurs biochimiques.

Une voie d'approche nouvelle à l'obtention de cellules transformées du système nerveux central a été ouverte par les travaux de A. Tixier-Vidal, P. Benda, F. de Vitry et leurs collaborateurs. Ces auteurs ont réussi à transformer par le virus SV40 des cellules d'hypothalamus d'origine murine et à cloner des populations cellulaires capables de produire en quantité importante les hormones stimulantes du système hypophysaire, notamment la TRH. Tous les systèmes décrits jusqu'à présent pèchent néanmoins par le même défaut : s'agissant de cellules transformées expérimentalement ou spontanément, elles sont généralement aneuploïdes et sont porteuses d'antigènes de surface anormaux. De nombreuses tentatives dues pour une large part aux écoles de Patterson, Ralph et leurs collaborateurs ont été réalisées pour « cultiver » des cellules provenant de ganglions sympathiques normaux dans des conditions compatibles avec une différenciation morphologique ou biochimique terminale. L'acquisition de phénotypes caractéristiques des cellules matures de ganglions sympathiques requiert dans tous les cas la présence de concentrations relativement élevées de NGF.

Ces expériences de mise en culture (ou plutôt ces systèmes de « survie », puisque les cellules ainsi transformées *in vitro* ne se divisent pas) se traduisent par l'expression de phénotypes différents selon que sont également présentes ou non des cellules d'autres lignées histogéniques capables de former avec les cellules ganglionnaires des contacts synaptiques ou pseudo-synaptiques. Ainsi, en l'absence de cellules musculaires ou de certaines cellules fibroblastiques, les cellules ganglionnaires d'origine sympathique synthétisent, libèrent ou concentrent les catécholamines (norépinéphrine). Elles ont une teneur élevée en TH et très faible en CAT, toutes propriétés attendues de cellules neurales d'origine sympathique. Par coculture avec des cellules satellites musculaires ou fibroblastiques on assiste à des changements profonds dans le phénotype des cellules ganglionnaires : accroissement considérable dans l'activité de la CAT, synthèse à taux élevé et libération d'acétylcholine, réduction de l'activité de la TH. Ces effets de réversion ou plutôt de modulation phénotypique s'observent également lorsque aux cellu-

les satellites on substitue le milieu au sein duquel elles ont été préalablement cultivées (milieu dit « conditionné »).

L'intérêt de ces observations réside dans la démonstration d'une certaine plasticité du programme d'expression génétique de la cellule neurale, ce « programme » pouvant être réorienté ou modifié selon le contexte physiologique. Les résultats de ces expériences de modulation *in vitro* sont d'ailleurs en plein accord avec les observations effectuées par les embryologistes (N. Le Douarin) en transplantant artificiellement les neuroblastes primitifs de la crête neurale de l'embryon de poulet en des territoires différenciés distincts de l'embryon de caille. Les mêmes cellules (reconnaissables par leur morphologies nucléolaires) peuvent exprimer selon le contexte des propriétés adrénergiques ou cholinergiques. Les mécanismes moléculaires de ces modulations demeurent inconnus.

Le reste de notre cours a été consacré à l'étude de certains des aspects biochimiques généraux de la neurogenèse terminale, au cours de la différenciation de cellules de neuroblastomes en cultures *in vitro*. Nous nous sommes notamment intéressés aux étapes suivantes :

— Différenciation des constituants membranaires : synthèse de glycoprotéines et de sphingolipides spécifiques, identification par marquages covalents des protéines majoritaires de « l'outer membrane », analyse par électrophorèse bidimensionnelle des sous-constituants membranaires après purification des membranes plasmiques par formation artificielle de microvésicules en présence de billes de latex.

— Polymérisation du tube neural : étude biochimique des  $\alpha$  et  $\beta$  — tubulines et des protéines liées aux microtubules ; rôle des facteurs « tau » et du GTP dans la polymérisation orientée des microtubules. Etude des neurofilaments.

— Synthèse de protéines dites « spécifiques » du neurone et des cellules gliales pouvant servir de marqueurs dans l'étude de la neurogenèse : GFA (ou « glial fibrillary acidic protein ») ; protéine S100 (trouvée en abondance dans les cellules gliales) ; protéines de type 14-3-2 ou 14-3-3 (formes isozymiques particulières de l'énolase).

— Etude des facteurs de croissance de la cellule nerveuse et en particulier du NGF (« nerve growth factor ») : propriétés moléculaires, structure et séquences des chaînes polypeptidiques ; précurseurs métaboliques ; récepteurs spécifiques ; mode d'action ; effets liés à la pénétration rétrograde etc.

F. G.

Ce cours a été complété par une série de séminaires dont les titres sont les suivants :

SÉMINAIRES

D<sup>r</sup> L. LEGAULT (Paris), *Un marqueur de la différenciation terminale du neurone : la protéine 14-3-2.*

D<sup>r</sup> B. CROIZAT (Paris), *Activité transcriptionnelle au cours de la différenciation du neuroblastome.*

Prof. N. LE DOUARIN (Paris), *Recherches sur le développement du système nerveux autonome chez l'embryon d'oiseau.*

D<sup>r</sup> Y. NETTER (Paris), *Analyse immunologique des composants de surface cellulaire. Applications au système nerveux.*

Prof. B. DROZ (Saclay), *Maintenance des circuits neuronaux : rôle du flux axonal et des échanges intercellulaires.*

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

BIOCHIMIE CELLULAIRE

GROUPE DE RECHERCHE DE L'INSTITUT PASTEUR

*Thèmes de recherche*

I. - Etudes des protéines de types « histones » présentes sur le nucléoïde des cellules procaryotiques.

(J. ROUVIÈRE-YANIV, N.O. KJELDGAARD, E. MAERTEN.)

II. - Expression génétique dans les cellules eucaryotes au cours de la différenciation.

— A. - Etudes des protéines « non histones » provenant de chromatine de souris (M. CRÉPIN).

— B. - Etude comparative des produits de transcription dans des cellules primitives ou différenciées chez diverses lignées de souris.

(M. JACQUET, N. AFFARA, B. ROBERT, R. GJERSET, A. WEYDERT.)

— C. - Etude des produits de l'expression génétique au cours de la myogénèse terminale.

(M. FISZMAN, M. BUCKINGHAM, J.C. LELONG, R. WKALEN, D. CAPUT, W. WRIGHT, G. BUTLER-BROWNE, J. SKORVE, P. DAUBAS, D. MONTARRAS.)

Bien que la plus grande partie de notre activité de recherche concerne les aspects génétiques du développement de la cellule eucaryote, l'une de nos équipes continue à s'intéresser aux propriétés de protéines d'*E. coli* qui présentent des parentés avec les histones (protéines Hu).

#### *Etude de la protéine Hu*

L'étude de la séquence primaire (en collaboration avec MM. SAUTIERE et LAINE, Lille) indique clairement une certaine microhétérogénéité dans la protéine. Ce résultat, joint au fait que la protéine est résolue en 2 composants par électrofocalisation, suggère l'existence d'au moins deux gènes codant pour Hu. L'étude comparée des séquences de la protéine Hu d'*E. coli* et d'*Aphanocapsa* (en collaboration avec AITKEN et KEIL) indique que la protéine a subi peu de changements évolutifs dans le règne des procaryotes. Sur 24 acides aminés en position N-terminale, 10 sont conservés, 7 sont le site d'un changement « conservatif » et 5 d'un changement dans l'une des bases du codon. Nous avons montré que Hu est associé au nucléoïde d'*E. coli* tel qu'on peut l'isoler à basse force ionique. Des expériences de reconstitution de nucléosomes avec de l'ADN circulaire à double brin semblent indiquer que Hu pourrait « condenser » le DNA d'une manière analogue à celle des histones (en collaboration avec J.E. GERMAUD, de Stanford).

#### *Etude sur les cellules eucaryotes*

Divers aspects liés à l'expression des gènes au cours du développement des cellules eucaryotes ont retenu notre attention.

#### *A - Evolution des populations de RNA au cours de la différenciation dans des lignées de souris*

On a comparé les complexités cinétiques des populations de messagers cytoplasmiques, dans des cellules pluripotentes de carcinome embryonnaire et dans des lignées de souris « déterminées », à la différenciation myogénique ou érythropoïétique. Les lignées sont analysées au stade de « blastes » ou de cellules différenciées. La majorité des espèces semblent se conserver pendant les stades terminaux de la différenciation avec des changements intervenant dans certaines classes d'abondance. La transition carcinome → myoblaste est accompagnée de l'expression d'un grand nombre d'espèces nucléaires et polysomales, ce qui suggère l'intervention d'une régulation *transcriptionnelle* dans l'acquisition d'un phénotype différencié. Ceci est corroboré par l'observation selon laquelle le messenger spécifique de la globine, décelable dans les compartiments nucléaires et polysomiques des cellules de Friend, est absent de ces deux compartiments chez le carcinome.

B. - *Expression des gènes du virus MMTV au cours de la différenciation*

Le virus endogène intégré à l'état de provirus ne s'exprime dans aucune lignée indifférenciée (tératocarcinome). En revanche, les myoblastes synthétisent des quantités d'ARN viral équivalentes à celles trouvées dans les cellules cibles de glande mammaire.

C. - *Rôle des protéines non histones dans l'expression génétique*

Des protéines non histones que nous avons purifiées se fixent à l'ADN de la chromatine de cellules homologues. Lorsque la chromatine des cellules de glande mammaire est saturée par ces protéines, la synthèse *in vitro* d'ARN viral MMTV avec l'ARN polymérase eucaryote est fortement stimulée.

D. - *Recherches sur la myogénèse*

a) *Transformation virale* : Des cellules de myoblastes de poulet, transformées par un mutant Ts du virus de Rous (RSV ts 68), ne se différencient ni morphologiquement ni biochimiquement (études des  $\alpha$  actines et des chaînes légères de myosine) aux températures permissives, mais récupèrent leur aptitude à la myogénèse après retour à 41 °C. Il semble donc qu'il existe un réglage pléiotropique de la différenciation myogénique terminale qui soit altéré par l'infection.

b) *Etude et purification des messagers* : Le laboratoire a investi de gros efforts dans l'étude des messagers cytoplasmiques et dans leur purification. Par centrifugation sur gradients de formamide ou séparation sur gels, nous avons pu obtenir des fractions de mRNA enrichies dans leurs capacités à stimuler la synthèse de protéines spécifiques dans des lysats de réticulocytes. Les sous-fractions purifiées correspondent aux messagers de l'actine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), de la myosine (chaînes lourdes et légères) et de la tropomyosine. Le repérage des protéines formées *in vitro* est réalisé par la technique d'électrophorèse bidimensionnelle ou par immunoprécipitation grâce aux anticorps spécifiques préparés en collaboration avec l'unité AVRAMEAS. Le degré de purification du messenger de la myosine (chaîne lourde) va permettre incessamment d'attaquer le clonage du gène correspondant.

D'autres études ont porté sur les classes d'abondance des messagers cytoplasmiques dans les compartiments correspondant aux RNP et aux polysomes respectivement. Leurs produits de traduction ont également été comparés.

c) *Biosynthèse des protéines cytoplasmiques et membranaires* : Grâce à la technique d'électrophorèse bidimensionnelle, nous avons pu retracer l'évolution des types isogéniques de protéines contractiles formées au cours du développement dans des cultures primaires ou dans des lignées établies ainsi qu'*in vivo*. Nous avons notamment démontré une transition des formes

$\beta\gamma$  de l'actine en forme  $\alpha$  (typique du sarcomère). Un nouveau type de chaîne légère de la myosine, baptisé chaîne embryonnaire ou  $LC_{1\text{ emb.}}$ , a été découvert. Elle constitue la seule forme de chaîne  $LC_1$  présente dans les lignées  $L_6$ . De plus il a été montré que la mise en culture des myoblastes à partir de suspensions de cellules musculaires dissociées conduit à l'expression du phénotype myosine LC « rapide » même lorsque le fragment musculaire prélevé est de phénotype « lent ». On est donc en mesure de suivre avec précisions les étapes de l'expression des gènes de myosine (chaînes légères) au cours de la transition des blastes en myotubes, grâce aux marqueurs  $LC_{1\text{ emb.}}$ ,  $LC_{2F}$ ,  $LC_{3F}$ ,  $LC_{2S}$ . En outre il est vraisemblable que la conversion des chaînes légères de type « rapide » en type « lent » ne peut se produire normalement dans les conditions de culture *in vitro*, ce blocage étant dû soit à un manque de facteurs trophiques soit à l'absence d'innervation.

Une autre transition isozymique qui a été étudiée en détail concerne le passage de la forme B à la forme M de la créatine phosphokinase.

Les protéines de surface ont été marquées à l'iode. Nous n'avons décelé aucune différence entre les protéines ainsi marquées chez les myoblastes et les myotubes.

#### d) *Cocultures de cellules musculaires et de cellules nerveuses*

Dans le but d'étudier l'influence d'une activité des cellules nerveuses sur les caractéristiques des cellules musculaires (phénotype des MLC, métabolisme et distribution des récepteurs de l'acétylcholine, forme moléculaire de l'acétylcholinestérase), nous avons commencé à mettre au point les cocultures de cellules musculaires de rat (cultures primaires) et d'explants de moelle épinière. Des contacts, sans doute de caractère synaptique, s'établissent et les premiers résultats indiquent un très haut degré de regroupement des récepteurs cholinergiques au voisinage des terminaisons nerveuses.

ÉQUIPE DU COLLÈGE DE FRANCE

### *Recherches sur la différenciation du neuroblastome murin C-1300*

#### A. - *Aspects cellulaires*

##### 1. *Etude des antigènes de surface*

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

L'un des buts que nous nous étions fixés en analysant les antigènes de surface du neuroblastome C-1300 était de détecter des antigènes communs entre le neuroblastome et le tissu nerveux et de les associer à des types cellulaires définis. Pour déceler de tels antigènes, on a recours à des immu-

nisations hétérologues qui peuvent produire des anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques du tissu dont dérive la tumeur. Nous avons précédemment montré, par adsorption, qu'une importante fraction des anticorps de lapin, préparés contre la forme différenciée d'un clone de neuroblastome ou d'un hybride neuroblastome — ganglion sympathique, réagissait avec le tissu nerveux. Nous avons poursuivi et approfondi la caractérisation des antigènes ainsi révélés, en particulier en ce qui concerne la corrélation entre les phénotypes morphologiques des cellules et la spécificité de notre sérum, définie par des adsorptions préalables.

Nous nous sommes attachées, au cours de cette année, à déterminer la spécificité cellulaire des antigènes révélés par nos antisérums. Dans ce but, nous nous sommes adressées à des cultures primaires de tissu nerveux, cerveau et ganglions périphériques. Dans de telles cultures, il est possible de classer les types cellulaires selon des critères morphologiques. Ainsi, les cultures de ganglions contiennent des cellules neuronales et des cellules de Schwann, ayant un aspect morphologique bien distinct; également des cellules neuroépithéliales et fibroblastiques, que l'on différencie aisément des précédentes et entre elles par l'absence ou la présence respective de striation cytosquelettique, caractéristique des fibroblastes. L'emploi de ces sérums adsorbés exhaustivement sur le foie de souris a permis de montrer par immunofluorescence sur les cultures, que les cellules fibroblastiques et les cellules de Schwann ne sont que très faiblement marquées; les cellules neuroépithéliales le sont plus fortement, et les cellules neuronales présentent un marquage intense. De surcroît, en choisissant judicieusement le régime d'adsorption de nos sérums — nous avons introduit une adsorption supplémentaire sur une lignée de cellules gliales — on parvient à marquer sélectivement les cellules neuronales, plus fortement au niveau des neurites que du soma cellulaire. Nous disposons donc d'un antisérum capable de reconnaître spécifiquement des cellules neuronales, à l'exclusion d'autres types cellulaires.

L'ensemble de nos observations souligne, en outre, l'existence d'une communauté antigénique entre le neuroblastome, les neurones du système nerveux périphérique et le cerveau. Si les observations faites sur ces deux types de cultures primaires de tissu nerveux sont comparables quant à la sélectivité du marquage, en revanche, la chronologie de ce dernier est différente. L'apparition des antigènes neuronaux dans les cultures de cerveau est plus tardive que dans les cultures de ganglions. Ces observations sont corroborées par les résultats d'expériences d'adsorption de nos sérums sur des cerveaux prélevés chez des embryons de souris d'âges différents. Cette différence temporelle correspond bien, d'ailleurs, à la chronologie de maturation morphologique et fonctionnelle de ces deux systèmes au cours de l'ontogenèse.

Par ailleurs, nous avons montré que l'un de ces antigènes, commun au neuroblastome et au tissu nerveux, est prépondérant sur les thymocytes de souris. La distribution tissulaire et la représentation cellulaire de cet antigène ont été explorées. Nous avons montré qu'il s'agit d'un antigène de différenciation exprimé dans deux tissus : dans le cerveau, il apparaît chez l'embryon de souris vers 14 jours et atteint le taux adulte dans les premières semaines qui suivent la naissance. Cet antigène apparaît aussi sur certaines des cellules du système hématopoïétique. Il apparaît dans le foie fœtal vers 12 jours, décroît progressivement avec la maturation embryonnaire et disparaît du foie dans les premiers jours qui suivent la naissance. Le foie fœtal constitue la source de cellules hématopoïétiques chez l'embryon. Chez l'adulte, cette fonction est remplie par la moelle osseuse. En effet, nous avons pu démontrer la présence de l'antigène en question sur certaines cellules de ce tissu. L'identification, au sein de la population totale, des types cellulaires qui portent cet antigène est en cours d'étude.

Il est à noter que l'ensemble des spécificités antigéniques révélées par nos sérums, en particulier celles qui viennent d'être décrites, sont spécifiques d'espèce mais communs à des souches différentes de souris.

Un autre aspect des antigènes de surface du neuroblastome qui a été étudié concerne la présence d'antigènes embryonnaires sur ces cellules. On sait que de nombreuses cellules tumorales réexpriment des antigènes embryonnaires, ce probablement en liaison avec la perte de régulation génétique de l'état différencié de ces cellules. Les données décrites dans notre précédent rapport, concernant la réactivité croisée existant entre le neuroblastome et des lignées tumorales établies en culture, révélée par un antisérum syngénique anti-neuroblastome, plaident en faveur d'antigènes embryonnaires comme responsables de cette réactivité croisée. Etant donné qu'aucun des tissus prélevés chez des embryons de souris à partir de 12 jours ne réagit avec notre sérum, l'implication d'antigènes caractéristiques de l'embryon précoce a été prise en considération. En collaboration avec le D<sup>r</sup> R. KEMLER, de l'équipe de F. JACOB, nous avons montré que notre sérum marque fortement, en immunofluorescence, des embryons précoces de stade huit cellules. La définition de ces antigènes embryonnaires est en cours.

## *2. Recherche sur la régulation de la transition neuroblaste-neurone stimulée par un facteur protéique*

(G. MERLIN et Y. BERWALD-NETTER)

Nous avons poursuivi nos études sur le principe actif, dérivé du milieu « conditionné » par une lignée établie de cellules de souris, qui stimule la différenciation morphologique du neuroblastome en culture.

Rappelons qu'en présence de ce facteur les neurites apparaissent beaucoup plus précocement — en quelques heures — et la proportion des cellules différenciées est également augmentée. Ceci a été montré sur tous les clones capables de former des neurites ainsi que sur des hybrides entre neuroblastome et cellules gliales de rat et entre neuroblastome et neurone sympathique de souris. Quant aux clones qui ne forment pas de neurites bien que possédant une enzyme spécifique du tissu nerveux, notre facteur ne leur donne pas la faculté d'émettre des neurites.

Des études préliminaires ont montré qu'il s'agissait sans doute d'une protéine : l'activité est détruite par la pronase et la trypsine mais résiste bien à l'ADNase comme à l'ARNase, ainsi qu'à la neuraminidase et à l' $\alpha$ -mannosidase.

Nos recherches sur ce facteur portent essentiellement sur trois domaines :

- la définition de son caractère original et nouveau,
- son mode d'action,
- sa purification.

En ce qui concerne l'identité de ce facteur, nous avons montré que des immunoglobulines anti-NGF ou anti-interféron n'abolissent pas l'activité de notre préparation, et que NGF comme interféron sont incapables de stimuler la différenciation de nos cellules dans les conditions où le facteur le fait ; les molécules semblent donc distinctes.

D'autre part, la recherche d'une activité sur d'autres systèmes de différenciation *in vitro* révèle que la préparation stimule également la différenciation du compartiment granulocytaire de la moelle osseuse de souris, et plus efficacement que le CSF de référence.

L'effet des inhibiteurs métaboliques — cycloheximide, actinomycine-D et cordycépine a été examiné. Tandis que tous les trois bloquent efficacement la poussée des neurites en l'absence du facteur, en sa présence, seul le cycloheximide empêche la différenciation morphologique. La stimulation observée sous l'effet de notre facteur est donc un effet dépendant de la synthèse protéique active, dont la régulation est post-transcriptionnelle. La différence de l'effet de la cordycépine et de l'actinomycine sur la différenciation des cellules en présence ou en absence du facteur semble due à la cinétique très différente de l'extension des neurites dans les deux cas : 4 à 8 heures avec le facteur, 24 à 48 heures en son absence.

Nos efforts les plus conséquents portent sur la purification de la — ou des — molécule(s).

Nous avons défini un test biologique qui permet de quantifier l'activité de notre facteur, et d'entreprendre une purification.

Après concentration, un chauffage à 55 °C permet d'activer le facteur tout en éliminant quelques impuretés qui précipitent. Suit une précipitation au sulfate d'ammonium entre 15 et 35 % de saturation, ce qui permet aussi d'éliminer quelques contaminants, comme le montrent des électrophorèses sur gel dénaturant de polyacrylamide.

Nous avons ensuite tenté deux approches différentes :

a) Des études sur gradient de glycérol (10 à 30 %) ont clairement montré que l'activité se trouvait dans une zone de poids moléculaire située entre 70 000 et 80 000 daltons, dans un tampon phosphate 0,05 M, pH = 7,2 ; mais la force ionique intervient et son augmentation semble provoquer une agrégation de molécules ; ceci expliquerait l'exclusion que nous avons observée lors de filtrations sur Biogel P-150 qui, alors, laissait augurer un poids moléculaire supérieur à 150 000 daltons.

b) Nous avons testé le comportement de notre protéine vis-à-vis de résines échangeuses d'ions. Il est très net que toute l'activité est fixée par la phosphocellulose à pH 7,2 dans le tampon phosphate 0,05 M, en présence de glycérol à 2,5 %, et qu'elle est éluée, dans un gradient de KC 1, vers 0,2 M. Si l'activité spécifique est augmentée, le rendement est assez moyen, et nos efforts tentent de remédier à ce défaut.

Nous envisageons de poursuivre cette purification en testant, par exemple, l'affinité du facteur pour des lectines ; d'autre part, un isoelectrofocalisation ou une électrophorèse préparative seraient sans doute susceptibles de parfaire ce travail, et nous œuvrerons jusqu'à obtenir une molécule pure, ce qui nous ouvrira tout un nouveau champ de recherches fort intéressantes, surtout en ce qui concerne le mode d'action.

## B. - *Aspects moléculaires*

Le programme concerne l'analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression du génome lors de l'évolution du neuroblaste vers l'état différencié.

Le système modèle choisi est le neuroblastome murin C-1300 en culture. Les résultats déjà obtenus permettent de s'adresser maintenant au tissu nerveux lui-même, au moins en ce qui concerne certains aspects de ces études.

Ce travail s'est développé à deux niveaux :

1) Analyse qualitative et quantitative des produits de transcription au cours de la différenciation terminale du neuroblaste.

2) Etude de l'expression de protéines marqueurs caractéristiques de l'état différencié.

1. *Mécanismes de transcription*

(B. CROIZAT, F. BERTHELOT, A. FELSANI, C. SAHUQUILLO)

L'analyse des poly(A)<sup>+</sup> RNA sur gradient de sucrose a montré que les variations d'activité transcriptionnelle qui accompagnent la différenciation cellulaire sont directement liées à la formation des neurites, c'est-à-dire à l'expression morphologique du type neuronal.

Afin d'établir une corrélation plus étroite entre expression du génome et expression morphologique du type neuronal, il était nécessaire de procéder à des comparaisons quantitatives précises entre le nombre de gènes exprimés et un état cellulaire donné. On a donc analysé les complexités de séquences de messagers des cellules non différenciées et différenciées en recourant aux techniques d'hybridation moléculaire RNA-DNA.

Des copies de DNA hautement radioactif (cDNA) des molécules de poly(A)<sup>+</sup> RNA messagers polysomiques ont été synthétisées au moyen de l'AMV transcriptase reverse.

L'analyse des cinétiques d'hybridation homologue entre le cDNA et un large excès de son RNA matrice permet de déterminer le nombre des séquences différentes de messagers ainsi que leur abondance relative au sein de la population. En outre, les hybridations croisées hétérologues permettent de calculer le degré d'homologie de séquences existant entre les poly(A)<sup>+</sup> RNA « non-différenciés » et « différenciés ».

Les résultats peuvent se résumer brièvement de la façon suivante :

— L'analyse mathématique des paramètres correspondant aux courbes d'hybridation homologues entre le mRNA et son propre cDNA révèle que les messagers se répartissent entre trois classes d'abondance comprenant au total 7 000 séquences environ. Ces caractéristiques sont communes aux cellules non-différenciées et différenciées.

— La courbe d'hybridation hétérologue entre le cDNA « différencié » et le poly(A)<sup>+</sup> RNA « non-différencié » montre que le RNA « non-différencié » contient toutes les séquences présentes dans le RNA « différencié ». Le nombre de copies de séquences correspondant à la classe d'abondance intermédiaire semble légèrement plus élevé dans le RNA « non-différencié ».

— La courbe d'hybridation hétérologue réciproque entre le cDNA « non-différencié » et le poly(A)<sup>+</sup> RNA « différencié » révèle, au contraire, qu'un certain nombre de séquences sont absentes dans ce RNA qui ne peut s'hybrider qu'avec 85 % du DNA présent. Ceci intéresse la classe de moyenne

abondance. Cette classe représente 41 % du DNA « hybridable » mais seulement 13 % de la complexité. Les séquences manquantes ne correspondent donc qu'à une petite fraction de la complexité totale, ce qui explique l'identité apparente des cinétiques d'hybridation homologues.

En résumé, la différenciation du neuroblastome s'accompagne de la disparition d'un petit nombre de messagers qui étaient transcrits en relativement grande quantité dans l'état non-différencié.

Ceci confirme les résultats concernant d'autres systèmes d'eucaryotes où le développement s'accompagne d'une réduction progressive de l'expression génétique.

Dans le cas du neuroblastome, on ne remarque pas, en outre, de modulation quantitative importante au niveau de certaines espèces de messagers. Ceci n'exclut pas, cependant, la possibilité de variations quantitatives forcément discrètes puisqu'on ne note pas de différences significatives au niveau de protéines majeures ni dans les cinétiques d'hybridation homologues mRNA-cDNA, correspondant aux deux stades cellulaires.

Parallèlement à l'étude du système de neuroblastome, il a été entrepris une analyse des complexités de séquences des aires cérébrales et du cerveau global de souris. Cette analyse s'articule également sur les hybridations moléculaires entre le RNA messager polysomique et son DNA complémentaire.

On a pu montrer que la complexité du cortex cérébral, correspondant à une dizaine de milliers de séquences, est analogue à celle des autres tissus (foie, rein etc.). Il sera intéressant d'examiner la complexité du cerveau global. Une complexité significativement plus élevée, comme le rapporte Bantle, pourrait simplement refléter l'hétérogénéité cellulaire de l'organe.

## *2. Analyse de l'expression de protéines marqueurs neuronales au cours de la différenciation terminale*

### *A. - Expression génétique de la tubuline*

(C. JEANTET, A. WOLFF, D. CHILLET, C. SAHUQUILLO)

L'analyse des mécanismes qui président à l'expression génétique de la tubuline trouve dans le neuroblastome un système biologique intéressant. Parce que les cellules de clones de neuroblastome NIE 115 en absence de division cellulaire sont, dans certaines conditions, compétentes pour la formation de neurites, parce que la tubuline participe au fuseau mitotique et aux structures polymériques de neurotubes, nous étudions la répartition des différentes formes des sous-unités de la tubuline dans des cellules en cours de division et dans des cellules en voie de différenciation. On sait, en effet,

que chaque sous-unité de la tubuline peut être présente sous plusieurs formes. Une telle étude permet par ailleurs de rechercher la nature des protéines associées à la tubuline et qui, dans les deux états phénotypiques (cellules arrondies et cellules pourvues de neurites), participent à l'assemblage de la protéine en microtubules. Notre intérêt se porte essentiellement sur le(s) facteur(s) Tau. De plus nous étudions ce mécanisme chez les cellules du clone de neuroblastome NIA 103 qui, dans les conditions normales de différenciation cellulaire, en absence de division cellulaire, ne forment pas de neurites. Cette étude devrait nous conduire à déterminer l'importance respective de la formation des neurites et celle de l'arrêt de division cellulaire dans les modifications éventuelles des protéines impliquées dans la synthèse de microtubules.

Par ailleurs, nous définissons les conditions techniques qui doivent nous permettre d'isoler le(s) RNA(s) messenger(s) de la tubuline. Ayant opté pour une sélection par une reconnaissance spécifique entre l'anticorps antitubuline et la protéine en cours de synthèse sur les polysomes, nous avons dans un premier temps, en collaboration avec C. LE GUERN, du laboratoire d'Immunochimie analytique de l'Institut Pasteur, préparé une colonne d'affinité sur laquelle se trouve fixé l'anticorps.

A ces deux approches de l'analyse des mécanismes impliqués dans l'expression génétique de la tubuline s'ajoute notre participation, grâce à l'utilisation d'une méthode de quantification très précise de la tubuline par essai radioimmunologique, à plusieurs projets intéressants des laboratoires de biologie cellulaire. Cette méthode, que nous avons mise au point, permet en effet de doser 50 picogrammes de la tubuline par essai.

*B - Expression de la protéine « 14-3-2 », émolase spécifique du neurone*  
(L. LEGAULT, Y. ZEITOUN, N. LAMANDÉ, C. SAHUQUILLO)

a) L'analyse de l'expression de cette protéine a été complétée. La « 14-3-2 », déjà immunologiquement détectable dans des cellules en croissance, s'accumule au cours de la différenciation terminale des neuroblastomes. Ce comportement est semblable à celui d'autres protéines marqueurs (tyrosine hydroxylase, acétylcholine transférase) dont les activités augmentent lors de la formation des neurites. Le même comportement est observé pour la protéines 14-3-2 et les enzymes des neurotransmetteurs dans des conditions variées de culture qui permettent l'arrêt des divisions cellulaires, sans pour autant induire la différenciation morphologique. L'accumulation de la protéine 14-3-2 relève donc d'une étape de « différenciation biochimique » indépendante du phénomène de « différenciation morphologique » qui requiert des signaux supplémentaires.

Deux lignées de cellules neuronales correspondant à des étapes de différenciation plus primitives que celle des neuroblastomes se sont révélées intéressantes en ce qui concerne l'expression « précoce » de la protéine 14-3-2. En effet, contrairement aux neuroblastomes, ces clones n'expriment pas du tout de protéine 14-3-2 avant la différenciation.

b) Ainsi dispose-t-on de clones correspondant à des étapes diverses du développement pour analyser les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression de cette protéine au cours de la différenciation. De telles études sont en cours.

i) Il convient en effet de vérifier si l'accumulation de la protéine 14-3-2 dans les cellules correspond à un changement de son taux de synthèse. De même veut-on établir si l'accumulation de cette protéine au cours de la différenciation correspond à une augmentation du niveau de son ARN messager cytoplasmique ou si ce dernier déjà présent voit s'accroître sa capacité à être traduit.

ii) Un autre aspect intéressant de cette protéine est à l'étude. Trois formes isozymiques émolase sont présentes dans le tissu nerveux. La forme I ( $\alpha\alpha$ ) est non spécifique de ce tissu cependant que la forme III ( $\gamma\gamma$ ) ou 14-3-2, et une forme II hybride ( $\alpha\gamma$ ) sont spécifiques. Les formes II et III apparaissent successivement au cours du développement et sont exprimées seulement dans le neurone.

La recherche des formes II et III parmi les différentes lignées neuronales et dans des cultures primaires, et l'évolution relative de ces formes au cours de la différenciation seront intéressantes.

c) Ces travaux ont exigé au préalable la purification de la protéine 14-3-2, l'obtention de l'antisérum spécifique et l'application de diverses techniques immunologiques. La mise au point d'un test de radioimmunologie est en cours, en collaboration avec le laboratoire du Professeur DRAY, à l'Institut Pasteur. Ceci devrait aider l'avancement de ce travail.

### C. - Evolution des formes moléculaires de l'acétylcholinestérase (AChE)

(D. LAZAR, C. SAHUQUILLO)

L'un des événements caractéristiques de la transition des cellules de neuroblastome vers l'état différencié est l'augmentation d'un certain nombre d'activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme des neurotransmetteurs. Ainsi, l'activité spécifique de l'AChE, enzyme essentiel dans la transmission cholinergique, peut augmenter par un facteur 25 au cours de ce processus : c'est le phénomène d'*induction*. L'AChE existe dans le tissu nerveux sous plusieurs formes moléculaires actives, de nature glycoprotéique, caractérisables par leurs propriétés hydrodynamiques. Nous avons observé

que cette hétérogénéité se retrouve au niveau de populations homogènes de cellules telles que les clones de neuroblastome : l'activité AChE extraite quantitativement en présence de Triton X 100 se répartit en trois formes de constantes 4 S, 6,5 S et 10 S. Pour caractériser les changements *qualitatifs* aussi bien que quantitatifs qui accompagnent la différenciation terminale du neuroblaste, nous avons entrepris, en collaboration avec L. GREENE (Harvard) et M. VIGNY (E.N.S.), d'analyser la répartition des formes actives de l'AChE au cours du processus d'induction et leur éventuelle localisation différentielle dans la cellule. Le clone choisi, NX 31 T 28, est un hybride, obtenu par fusion somatique entre le neuroblastome N 18 TG 2 et des neurones sympathiques embryonnaires, qui, par divers critères morphologiques, biochimiques et électrophysiologiques, se comportent comme des neurones sympathiques normaux. Ses propriétés ont été le plus souvent examinées en parallèle avec celles du neuroblastome parental N 18 TG 2. D'un ensemble d'expériences comportant une analyse :

— des cinétiques partielles d'induction de chacune des formes de l'AChE au cours du cycle de croissance des cellules attachées ou en suspension et au cours de l'extension des neurites,

— des cinétiques de régénération après élimination de l'enzyme préexistant par un inhibiteur irréversible (le DFP),

— de la répartition des formes de l'enzyme dans des fractions subcellulaires (solubles, membranes internes, membranes plasmiques purifiées) et dans les cellules intactes traitées par la phospholine (inhibiteur irréversible peu liposoluble),

— de l'activité AChE sécrétée par les cellules dans le milieu de culture, on peut tirer les conclusions suivantes :

1) Il y a une accumulation préférentielle de 10 S au cours du processus d'induction chez certains clones tels que NX 31 T 28 qui module son taux de 10 S entre 15 % de l'activité globale en phase logarithmique de croissance à 65 % à l'état pleinement différencié. Les cellules sont ainsi capables de mimer en culture le phénomène de « maturation » de l'AChE décrite *in vivo* pour le cerveau de rat en voie de développement.

De plus, il semble exister une relation métabolique entre les trois formes qui comporte un assemblage du 4 S en formes plus complexes 6,5 et 10 S. Cet assemblage implique des signaux régulateurs autres que le remplissage du pool de 4 S au cours de l'induction et peut s'exprimer, dans l'état post-mitotique des cellules, avant l'extension des neurites.

2) Il existe une localisation différentielle des formes légères et lourdes de l'AChE : seule la forme 10 S est immédiatement accessible à la phospholine sur les cellules intactes et se retrouve sur les membranes plasmiques purifiées.

3) Une part importante de l'enzyme néosynthétisé est sécrétée dans le milieu de culture. La sécrétion préférentielle de 10 S par les ganglions sympathiques en survie *in vitro*, qui a été récemment décrite, et l'existence d'une forme lourde de l'AcChE dans le liquide céphalo-rachidien *in vivo* suggèrent qu'il s'agit là d'un aspect physiologiquement important du métabolisme de cet enzyme. Nos expériences en cours devraient permettre de préciser la contribution de ce phénomène à la modulation de l'activité acétylcholinestérasique cellulaire. L'évolution des formes moléculaires de l'AcChE semble ainsi un bon indice de la maturation de la membrane plasmique des cellules de neuroblastome en voie de différenciation. Nous nous proposons donc maintenant d'aborder l'étude des mécanismes régulateurs qui contrôlent la néosynthèse du 4 S et son assemblage. Comme dans le cas des autres marqueurs protéiques étudiés dans notre groupe, il sera nécessaire en tout premier lieu d'obtenir un anticorps contre l'enzyme purifié de mammifères.

#### D. - Isolement de la tyrosine hydroxylase (TH)

(J. THIBAUT, R. DRISSI)

La tyrosine hydroxylase (TH) catalyse la transformation de la L-tyrosine en L-dihydroxyphényl-alanine. L'activité de cet enzyme est soumise à de très importantes modifications au cours de différents stades de différenciation du neuroblastome sans qu'il ait pu être établi qu'il s'agissait de changement dans la quantité de protéine présente ou d'activation et d'inhibition de l'enzyme lui-même.

La TH n'a pas été étudiée sous sa forme native et seule est isolée une protéine active obtenue par protéolyse ménagée d'un culot microsomal de médullo-surrénale.

Nous avons entrepris la purification de la tyrosine hydroxylase de rat à partir d'une tumeur transplantable de la glande surrénale qui en contient une très grande quantité : le phéochromocytome. La purification a fait appel aux techniques classiques et se termine par une électrophorèse en gel d'acrylamide conduisant à une protéine très pure d'une masse moléculaire supérieure à 200 000 et qui, par traitement au lauryl sulfate de sodium, se scinde en fragments de 60 000. Jusqu'à maintenant, le rendement de purification est très faible et ne permet pas encore d'obtenir un antisérum. Par contre, il nous est possible d'étudier le comportement de cet enzyme vis-à-vis de son substrat et une étude enzymologique est en cours de réalisation.

### 3. Synthèse *in vitro* du facteur de croissance du nerf (NGF)

(J. THIBAUT, D. VIDAL)

La culture *in vitro* de cellules nerveuses provenant de ganglions sympathiques nécessite la présence, de facteur de croissance du nerf (NGF), en plus du milieu de base et du sérum de veau fœtal. Les glandes salivaires sous-maxillaires des souris mâles en contiennent une quantité importante, quoique cet organe ne paraisse pas posséder vis-à-vis des nerfs une quelconque fonction.

Très récemment deux types de récepteurs du NGF, l'un membranaire, l'autre nucléaire, ont été mis en évidence sur des cellules nerveuses mais, par contre, on ignore tout des cellules sources du NGF nécessaire à la formation et au maintien du système nerveux sympathique.

Pour tenter de localiser les cellules qui sécrètent le NGF, nous avons fait appel aux techniques de la biologie moléculaire et de l'immunologie. En effet si, à partir des glandes salivaires de souris, il est possible d'isoler le RNA messenger de ce facteur, il sera aisé de réaliser à l'aide de la transcriptase-reverse du virus de la myéloblastose aviaire une copie du DNA complémentaire (cDNA) radioactif de ce RNA ; l'hybridation de ce DNA avec les RNA messagers de cellules embryonnaires devrait faciliter la compréhension du mécanisme d'implantation du système nerveux.

Le NGF a été purifié à partir des glandes salivaires (1 000 souris ont permis d'obtenir 30 mg de protéine pure). 5 mg de cette préparation ont servi à immuniser des lapins et un antiserum monovalent hautement spécifique a été obtenu. En collaboration avec l'équipe du Professeur Thøenen, du Biozentrum de Bâle (Suisse), nous avons pu démontrer que non seulement l'anticorps précipitait avec l'antigène, mais également que le NGF perdait son activité biologique en présence de l'antisérum.

La purification du RNA messenger des glandes salivaires a été entreprise. Une fraction des RNA contenant des séquences poly A a été isolée par colonne de cellulose oligo dT puis centrifugée sur gradient de saccharose.

Introduits dans un système acellulaire de germe de blé, ces RNA ont pu être traduits en protéines. L'analyse des produits de synthèse sur gel d'acrylamide en présence de laurylsulfate de sodium a permis de mettre en évidence, d'une part les différences quantitatives des protéines exprimées génétiquement entre les mâles et les femelles, ce qui démontre que le dimorphisme sexuel de ces glandes est déjà réalisé au niveau de la transcription génétique ; d'autre part, l'immunoprécipitation de produits de synthèse protéique a apporté la preuve que le NGF était synthétisé sous la forme d'un précurseur d'une masse moléculaire supérieure à 22 000. La détermination précise de la masse molé-

culaire fait l'objet de nos recherches actuelles. D'autre part, le RNA messenger isolé des glandes salivaires est en cours de fractionnement ; il renferme cinq espèces majeures dont l'une d'entre elles pourrait coder pour ce pré-curseur du NGF.

## ENZYMOLOGIE

Le groupe de recherche n° 6 du C.N.R.S. 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

#### A. - *Octopine déshydrogénase*

La recherche sur l'octopine déshydrogénase s'est développée principalement dans deux directions : étude des interactions enzyme-coenzyme-ligands et caractérisation des formes multiples de l'enzyme.

1) L'utilisation d'un analogue de coenzyme biologiquement inactif, le thio-NAD(H), a permis d'élucider partiellement le mécanisme moléculaire responsable de l'apparente athermie de la fixation du coenzyme sur l'octopine déshydrogénase (A. OLOMUCKI, F. THOMÉ, M.-O. MONNEUSE-DOUBLET, en collaboration avec le Prof. P. L. LUISI et son équipe de l'E.T.H. de Zürich).

2) Grâce à la modification de la méthode de purification il a été possible d'obtenir séparément les deux formes de l'enzyme se différenciant par leurs charges. Elles n'ont aucune spécificité d'organe. Les résultats des études cinétiques et structurales ont montré que ces deux formes ne présentent apparemment pas de différence au niveau de leurs sites catalytiques ; leur composition globale en acides aminés est très semblable (M.-O. MONNEUSE-DOUBLET, F. LEFÉBURE et A. OLOMUCKI).

#### B. - *ATP-phosphotransférases*

##### 1) *Arginine kinase*

###### a) *Etude cristallographique*

L'étude aux rayons X des cristaux d'arginine kinase infiltrés de Pt ou de Hg, préparés au laboratoire (C. DUBORD, L.-A. PRADEL) est poursuivie à l'Institut Pasteur (J. JANIN, M. GADET, M. RENAUD, R. FOURME).

b) *Etude de résonance magnétique nucléaire*

L'étude des enzymes native et modifiée, dans leurs différents complexes avec les substrats, a permis d'identifier, parmi les 8 résidus histidyles individualisés dans la protéine, deux résidus situés au centre actif. His 4 est proche du métal activateur et du phosphoryle  $\beta$  du substrat nucléotidique. His 1 est identifiable au résidu essentiel caractérisé par modification chimique (D. B. PHO, R. KASSAB, L.-A. PRADEL en collaboration avec M. ROUX, du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay).

2) *Hexokinase de levure*

Après la caractérisation du résidu glutamyle essentiel, la modification chimique de l'enzyme a permis de mettre en évidence un résidu arginyle qui interréagit avec le phosphoryle transférable de l'ATP ou du glucose-6-phosphate (D. B. PHO, M. PHILIPS, L.-A. PRADEL).

II. - ACTINES MUSCULAIRES ET CYTOPLASMIQUES

1) La recherche des formes isozymiques de l'actine dans quelques tissus non-sarcomériques a permis de sélectionner deux sources contenant l'une l'actine  $\beta$  enrichie à plus de 80 %, et l'autre l'actine  $\gamma$  dans des proportions semblables (F. LANDON et A. OLOMUCKI).

2) L'étude des conditions de polymérisation de l'actine de plaquettes sanguines humaines a montré une grande similitude avec celles requises par la polymérisation de l'actine sarcomérique (F. THOMÉ, C. HUC et A. OLOMUCKI).

3) La recherche du mode de régulation par le calcium de l'activité de la  $Mg^{++}$ -ATPase de l'actomyosine de plaquettes sanguines a été entreprise. Les résultats déjà obtenus semblent indiquer l'existence d'une régulation reliée à la myosine (C. HUC, F. THOMÉ et A. OLOMUCKI).

4) Il a été démontré par les études physiocochimiques que la polymérisation de l'actine pouvait être induite par les polyamines biologiques. Ces résultats ont conduit à émettre des hypothèses sur le rôle de ces composés dans la division cellulaire (C. ORIOL).

5) Les études qui ont été poursuivies sur la cristallisation de l'actine musculaire ont permis d'obtenir deux formes cristallines différentes (C. ORIOL et C. DUBORD).

## CHIMIE BIOORGANIQUE

L'équipe de M. M. OLOMUCKI a poursuivi des recherches sur de nouveaux composés d'intérêt biologique.

Des études sur les bases puriques ont été entreprises. Elles concernent en premier lieu les dérivés de l'éthéno-1,N<sup>6</sup>-adénosine, sonde fluorescente utilisée pour l'étude de divers systèmes biologiques. En liaison avec MM. P. WAHL et J.-C. BROCHON du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans, on se propose de synthétiser une éthéno-adénosine portant un fragment permettant de l'attacher par une liaison covalente à une macromolécule biologique. Dans une première étape, différentes méthodes sont testées pour souder à l'adénosine une chaîne latérale réactive : réaction de l'adénosine avec un ester bromoacétique ; celle de la chloro-6 purine avec un  $\omega$ -aminoacide ou l'hydrazine ; réaction de cette dernière avec la bromo-8 adénosine.

En collaboration avec D. HAYES et A. EXPERT-BEZANÇON (Laboratoire de Chimie Cellulaire, Institut de Biologie Physico-Chimique à Paris) ont été mis au point deux nouveaux réactifs de pontage réversible ARN - protéines, destinés à l'étude de la structure des ribosomes d'*E. coli*. Les deux composés sont des dérivés de l'acide tartrique relié à un fragment photoactivable nitrophényle. L'un de ces produits comprend, en outre, un cycle maléimide réagissant spécifiquement avec les groupements thiol des protéines et l'autre, une fonction imidoester spécifique des amines. Le groupement  $\alpha$ -glycol de l'acide tartrique, clivable par oxydation, donne la possibilité de rompre les pontages effectués à l'aide de ces réactifs. Des tests modèles ont montré que le comportement chimique de ces molécules était conforme aux prévisions ; des essais d'application de ces réactifs à l'étude des ribosomes sont effectués au laboratoire de D. HAYES.

L'un des réactifs synthétisés précédemment, la N-(p-chloromercuriphényl) chloro-4 dinitro-3,5 benzamide, a été utilisé au laboratoire du prof. H. G. WITTMANN à Berlin pour étudier l'agencement protéines - ARN dans les ribosomes. Ce composé est capable de ponter les groupements SH des protéines avec l'ARN avec des rendements allant jusqu'à 25 %. Toutefois, la formation simultanée de nombreux pontages inter-protéines a jusqu'à présent compliqué l'étude plus détaillée des agrégats obtenus. Le même produit est actuellement utilisé au laboratoire du Prof. H. SHARAT CHANDRA à Bangalore (Inde) pour l'étude de la chromatine, dans celui du Prof. L. PACKER à l'Université de Berkeley (USA) pour l'étude de l'interaction cytochrome c - cytochrome oxydase et dans celui du prof. W. V. SHAW à l'Université de Leicester (Grande-Bretagne) pour l'étude de la structure quaternaire d'un

enzyme tétramérique, la chloramphénicol acétyltransférase. Une collaboration avec différentes équipes des professeurs J. P. EBEL et P. MANDEL à Strasbourg est également poursuivie.

## ENDOCRINOLOGIE

Les recherches ont pour but d'étudier le transport, les effets et le mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes.

### *Transport*

La majeure partie des hormones thyroïdiennes circulantes est transportée par des protéines sériques spécifiques. La thyroxine se lie préférentiellement à une  $\alpha$ -globuline et, secondairement, à une préalbumine tandis que la 3,5,3'-triiodothyronine a comme protéine vectrice exclusivement l' $\alpha$ -globuline. Nous avons établi, dès 1959, avec le Recteur Roche la présence dans le sang de 3,3',5'-triiodothyronine. Nous avons étudié directement avec des doses traçuses de cette iodothyronine marqué par  $^{125}\text{I}$  la fixation aux protéines sériques. Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide du sérum et séparation des protéines nous avons trouvé que l'albumine et la préalbumine lient la 3,3',5'-triiodothyronine tandis qu'aucune fixation n'est mise en évidence avec l' $\alpha$ -globuline (M. BAUDRY, J.-P. CLOT, V. BOUTROUX et R. MICHEL).

### *Effets*

Le foie en régénération constitue un bon matériel pour l'étude de la biogénèse des particules subcellulaires, en particulier des mitochondries puisque, dans les jours qui suivent l'hépatectomie partielle, le tissu restant double de poids. Comme la thyroïdectomie provoque une diminution de la synthèse des protéines nous avons étudié chez le rat thyroïdoprive les propriétés des mitochondries isolées du foie en régénération.

L'ablation de plus des 2/3 du foie entraîne chez l'animal thyroïdectomisé comme chez le normal une diminution de l'activité des enzymes de la membrane externe, une stimulation des oxydations phosphorylantes et de la vitesse de renouvellement des protéines mitochondriales. Il ne semble donc pas que les hormones thyroïdiennes jouent un rôle essentiel dans le processus de régénération hépatique (J. BOUHNİK, O. MICHEL, J.-P. CLOT, M. BAUDRY et R. MICHEL).

### *Mécanisme d'action*

— La mitochondrie est capable de synthétiser une partie des protéines de sa membrane interne. Cette synthèse est inhibée par le chloramphénicol. Nous avons étudié chez le rat l'influence du chloramphénicol sur la biosynthèse protéique des mitochondries hépatiques. L'administration de chloramphénicol pendant 3 jours diminue les concentrations mitochondriales des cytochromes a, b et c<sub>1</sub> alors que celle des cytochromes c reste inchangée. Les activités des enzymes de la membrane externe ne sont pas modifiées alors que celles de la membrane interne sont abaissées. L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide montre que l'antibiotique provoque la diminution d'une fraction protéique mitochondriale de masse moléculaire 54 000 daltons. Les travaux précédents avaient mis en évidence le fait que la thyroïdectomie se traduit par des effets analogues. Il est donc vraisemblable que l'action des hormones thyroïdiennes se manifeste au niveau du système de synthèse protéique mitochondrial au même site que le chloramphénicol (J.-P. CLOT, M. BAUDRY et J. BOUHNİK).

— Les observations cliniques semblent montrer que l'hypothyroïdie provoque une diminution de la fonction corticosurrénalienne sans que l'on sache par quel mécanisme cette manifestation se produit. Nous avons entrepris des recherches afin d'obtenir de nouvelles données sur les effets de la thyroïdectomie au niveau subcellulaire de la corticosurrénale de rat.

Les activités de la 11  $\beta$  hydroxylase mitochondriale et celle de la 21-hydroxylase microsomale sont diminuées d'environ 30 % chez l'animal thyroïdectomisé. Ces réponses sont probablement indépendantes de la sécrétion d'ACTH puisque les concentrations plasmatiques de celle-ci ne sont pas diminuées mais, au contraire, faiblement augmentées. La thyroïdectomie ne semble pas influencer les oxydations phosphorylatives alors qu'elle provoque une diminution d'environ 27 % de la teneur en cytochrome P 450, lequel constitue l'oxydase terminale des systèmes hydroxylants mitochondriaux. L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines mitochondriales et microsomales révèle que la fraction protéique de masse moléculaire 52 000 daltons est diminuée d'environ 30 % ; cette fraction renferme les sous-unités du cytochrome P 450. L'incorporation de la leucine radioactive par les mitochondries isolées des corticosurrénales de rats thyroïdectomisés est abaissée également de 30 %. L'analyse électrophorétique des protéines marquées montre que la radioactivité ne se retrouve que dans la fraction protéique de masse moléculaire inférieure à 47 000 daltons.

En conclusion, notre travail met en évidence le fait que la protéine de l'oxydase terminale essentielle pour la corticogénèse est diminuée par la thyroïdectomie. Cependant, comme la biosynthèse du cytochrome P 450 ne semble pas dépendre du génome mitochondrial, il apparaît que l'action pri-

maire des hormones thyroïdiennes, qui contrôle directement le mécanisme des hydroxylations, doit se situer au niveau nucléaire (C. NÉGRÉ, J. BOUHNİK, O. MICHEL et R. MICHEL).

#### COLLOQUES, MISSIONS, DISTINCTIONS

Le Professeur François GROS a été invité par l'Académie des Sciences de l'U.R.S.S. à prononcer une série de conférences à l'Institut de Biologie Moléculaire (Moscou), à l'Institut des Substances Naturelles (Novosibirsk) et il a participé au Colloque Franco-Soviétique de Tashkent, organisé sous les auspices du Ministère des Affaires Etrangères (septembre 1977).

Il a participé au Symposium Pasteur-Weizmann de Neurobiologie (Institut Weizmann, Rehovoth, Israël) et y a prononcé une conférence (octobre 1977).

Sur invitation des Instituts Oswaldo-Cruz et A. Lutz (Brésil) il a donné deux conférences générales sur « la Biologie du Développement » (novembre 1977).

Il a également pris part aux Journées Biochimiques Franco-Maghrébines organisées par le C.N.R.S. et le Ministère des Affaires Etrangères avec le concours de l'I.C.R.O. et a donné une conférence générale, devant l'Université de Tunis, sur « la Biologie Moléculaire du Muscle » (avril 1978).

Invité par la Conférence Européenne de Biologie Moléculaire (E.M.B.O.), il a donné l'une des conférences d'ouverture pour l'inauguration officielle du Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire à l'Université de Heidelberg (avril 1978).

Il a participé enfin au Colloque International de Neurobiologie organisé à l'Université de Téhéran par l'I.B.R.O. et y a donné une conférence sur « la régulation des protéines musculaires et des chimio-récepteurs » (mai 1978).

Il doit également faire une série de séminaires de Biologie Moléculaire en juin 1978 sur invitation de l'Institut J. Salk à la Jolla (U.S.A.).

Le Professeur GROS a été nommé membre correspondant de l'Académie des Sciences (section Biologie) en février 1978.

M<sup>me</sup> Y. NETTER a présenté une communication à l'International Congress on Neuroblastoma, Gênes, Italie (juin 1977) et à la Gordon Conference on « Regulation of Phenotypic Expression in Transformed Cells », New Hampshire, U.S.A. (août 1977). Elle a donné une conférence au Department of Biology, Johns Hopkins University, Baltimore, U.S.A. (septembre 1977) ; à

l'Institut de Recherche sur le Cancer, Villejuif (décembre 1977) ; à l'University College, Department of Zoology (Laboratoire du D<sup>r</sup> Martin Raff), Londres (janvier 1978) ; à l'Institut Pasteur, Paris (février 1978).

M. B. CROIZAT a présenté une communication à l'International Congress on Neuroblastoma, Gênes, Italie (juillet 1977).

M. C. JEANTET a fait une série de conférences sur son travail au cours d'une mission scientifique à l'Institut de Biologie de l'Université de l'Etat de Rio de Janeiro au Brésil.

M<sup>me</sup> L. LEGAULT a assisté à une réunion de l'I.N.S.E.R.M. sur « Le système nerveux central en culture. Apports pour les problèmes d'ontogenèse ». Paris, juin 1977. Elle a participé à une table ronde dans le cadre du Symposium sur « Nervous specific proteins ». Amsterdam, août 1977.

M<sup>mes</sup> A. OLOMUCKI, C. ORIOL, F. LANDON, C. HUC et F. THOMÉ ont présenté des communications au Colloque du Cercle Français de Biologie Cellulaire, Paris, septembre 1977, et au 6th Meeting of the European Muscle Club, Saclay, septembre 1977.

M. D. B. PHO, M<sup>mes</sup> M. PHILIPS et L.-A. PRADEL ont présenté une communication à la Réunion commune des Sociétés de Chimie Biologique allemande, française et suisse, à Freiburg im Breisgau, octobre 1977.

M<sup>me</sup> C. ORIOL a présenté une communication au Colloque de la Société de Chimie biologique sur les « Aspects moléculaires de la motilité cellulaire », Orsay, mai 1978.

M. M. OLOMUCKI a participé au Colloque sur les « Aspects physico-chimiques des interactions protéines-acides nucléiques », à Roscoff, à la 7<sup>e</sup> réunion du Groupe d'études structure-activité à Toulon et au Symposium du Groupe de Chimie Hétérocyclique à Lille.

Le professeur R. MICHEL a présenté une conférence sur le métabolisme des hormones thyroïdiennes à la Faculté de Médecine de Montpellier, en mai 1977. Il a participé avec M<sup>me</sup> O. MICHEL, M<sup>me</sup> C. NÉGRÉ, MM. M. BAUDRY et J.-P. CLOT, à la réunion de l'Association Européenne de Recherche sur la Glande thyroïde, Lyon, septembre 1977. Il a présidé une séance aux Journées de la Fondation de Recherche en Hormonologie, Fresnes, novembre 1977.

#### THÈSES, DIPLOME

M<sup>me</sup> A. KOULAKOFF a soutenu une thèse de 3<sup>e</sup> cycle intitulée : » *Etude de l'antigénicité de surface du neuroblastome C 1300* » (20 juin 1978).

M. G. MERLIN a soutenu une thèse de 3<sup>e</sup> cycle intitulée : « *Etude d'un facteur stimulant de la différenciation morphologique du neuroblastome de souris in vitro* » (11 juillet 1978).

M. M. JERRAM a obtenu un D.E.A. de Chimie organique (Université Paris VI) intitulé : « *Synthèse d'un réactif de pontage ARN-protéines, destiné à l'étude de la structure des ribosomes* ».

#### PUBLICATIONS

N. A. AFFARA, M. JACQUET, H. JAKOB, F. JACOB et F. GROS, *Comparison of polysomal polyadenylated RNA from embryonal carcinoma and committed myogenic and erythropoietic cell lines* (*Cell*, 1977, 12, p. 509-520).

M. E. BUCKINGHAM, *Muscle protein synthesis and its control during the differentiation of skeletal muscle in vitro* (*International Rev. of Biochem., Biochemistry Cell Differentiation*, 1977, vol. 15, J. Paul éd., University Park Press, Baltimore, p. 269-332).

M. E. BUCKINGHAM, R. G. WHALEN, S. GOTO et F. GROS, *Messenger ribonucleic acid metabolism during myogenesis* (*Biochem. Soc. Transactions*, 1977, 5, p. 474-477).

M. JACQUET, N. A. AFFARA, H. JAKOB, J. F. NICOLAS, F. JACOB et F. GROS, *Complexity of polysomal messenger RNA in mouse teratocarcinoma cell lines* (in *The Organization and Expression of the Eukaryotic Genome, Proc. Internat. Symp. Tehran, 1976*, E. M. Bradbury et K. Javaherian éd., Academic Press, London, 357-372).

M. JACQUET, D. CAPUT, E. FALCOFF, R. FALCOFF et F. GROS, *The use of a complementary DNA probe to detect accumulation of Mengo RNA in infected cells pretreated with interferon* (*Biochimie*, 1977, 59, p. 189-195).

M. JACQUET, S. LEVY, B. ROBERT et F. GROS, *Chromatin transcription : I. Quantitative determination of gene-specific RNA by use bacterial plasmids containing the eukaryotic DNA sequence of viral DNA* (*Gene*, 1977, 1, p. 373-383).

J. P. MERLIE, M. E. BUCKINGHAM et R. G. WHALEN, *Molecular aspects of myogenesis* (in *Current Topics in Developmental Biology*, 1977, vol. II, A. Monroy et A. Moscona éd., Academic Press, New York, p. 61-114).

J. ROUVIÈRE-YANIV, R. HASELKORN, F. GROS et C. REISS, *Histone-like proteins in prokaryotic organisms and their interactions with DNA* (in *The*

*Organization and Expression of the Eukaryotic Genome, Proc. Internat. Symp. Tehran, 1976*, E. M. Bradbury et K. Javaherian, édés., Academic Press, London, p. 211-232).

R. G. WHALEN et F. GROS, *The translation of globin messenger RNA with use of muscle initiation factors (Biochim. Biophys. Acta, 1977, 475, p. 393-402).*

M. CREPIN, *In vitro mouse mammary tumor virus transcription from chromatin (FEBS Lett., 1977, 84, p. 266-270).*

A. C. KATO, P. LEFRESNE, Y. BERWALD-NETTER, J. C. BEAUJOUAN, J. GLOWINSKI et F. GROS, *Choline stimulates the synthesis of acetylcholine and accumulation of acetate in a cholinergic neuroblastoma clone (Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977, 78, p. 350-356).*

Y. BERWALD-NETTER, C. JEANTET et C. VIMARD, *Phenotypic modulation in mouse neuroblastoma cells: the case of acetylcholinesterase (J. Natl. Cancer Inst. Monograph, 1978, N° 46).*

Y. BERWALD-NETTER et A. KOULAKOFF, *Surface antigens of mouse neuroblastoma cells. Analysis after xenogeneic and isogeneic immunisations (in International Symposium on Neuroblastoma, 1978, sous presse).*

A. KOULAKOFF et Y. BERWALD-NETTER, *The immune response to blastic and differentiated neuroblastoma cells (Cancer Research, 1978, soumis pour publication).*

Y. BERWALD-NETTER et A. KOULAKOFF, *Neuronal surface antigenic marker(s) revealed by rabbit anti-mouse neuroblastoma sera (Nature, 1978, soumis pour publication).*

Y. BERWALD-NETTER et A. KOULAKOFF, *A differentiation antigen shared by mouse brain, thymocytes and fetal liver, revealed by rabbit anti-neuroblastoma serum (Nature, 1978, soumis pour publication).*

B. CROIZAT, F. BERTHELOT, A. FELSANI et F. GROS, *Changes in the pattern of poly(A)-containing RNA during terminal differentiation in neuroblastoma cells (FEBS Lett., 1977, 83, p. 163-167).*

A. FELSANI, F. BERTHELOT, F. GROS et B. CROIZAT, *Complexity of polyosomal polyadenylated RNA in undifferentiated and differentiated neuroblastoma cells (Eur. J. Biochem., 1978, sous presse).*

C. LE GUERN, P. PRADELLES, F. DRAY, C. JEANTET et F. GROS, *Radioimmunoassay for tubulin detection (FEBS Lett., 1977, 84, p. 97-100).*

C. ORIOL et C. DUBORD, *Deux formes cristallines d'actine (Biol. Cell, 1977, 30, p. 15a).*

A. OLOMUCKI, F. LANDON, C. HUC et F. THOMÉ, *L'actine de plaquettes sanguines humaines : composition isozymique et comparaison avec l'actine sarcomérique* (Biol. Cell, 1977, 30, p. 15a).

J.-C. BROCHON, P. WAHL, M.-O. MONNEUSE-DOUBLET et A. OLOMUCKI, *Pulse fluorimetry study of octopine dehydrogenase. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide complexes* (Biochemistry, 1977, 16, p. 4584-4599).

F. LANDON, C. HUC, F. THOMÉ-BEAU, C. ORIOL et A. OLOMUCKI, *Human platelet actin. Evidence of  $\beta$  and  $\gamma$  forms and similarity of properties with sarcomeric actin* (Eur. J. Biochem, 1977, 81, p. 571-577).

G. DESVAGES, C. ROUSTAN, A. BREVET et L.-A. PRADEL, *Identification du groupement glutamique essentiel de la 3-phosphoglycérate kinase de levure* (Compt. Rend. Acad. Sci, 1977, 284, p. 1461-1464).

A. FATTOUM, J. FEINBERG, G. DESVAGES et C. ROUSTAN, *Position de la cystéine dans la structure primaire de la 3-phosphoglycérate kinase de levure* (Compt. Rend. Acad. Sci., 1977, Sér. D, 284, p. 1843-1846).

A. FATTOUM, C. ROUSTAN, J. FEINBERG, G. DESVAGES et L.-A. PRADEL, *Structural studies on yeast 3-phosphoglycerate kinase. Isolation by affinity chromatography and characterization of the peptides produced by cyanogen bromide cleavage. Location of the single cysteinyl residue in the primary structure* (Eur. J. Biochem., 1978, 82, p. 161-167).

D. B. PHO, C. ROUSTAN, A. NGUYEN THI TOT et L.-A. PRADEL, *Evidence for an essential glutamyl residue in yeast hexokinase* (Biochemistry, 1977, 16, p. 4533-4537).

A. BAICI, R. JOPPICH-KUHN, P. L. LUISI, A. OLOMUCKI, M.-O. DOUBLET et F. THOMÉ-BEAU, *Fluorescence properties of thio-NADH and of its complex with octopine dehydrogenase* (Eur. J. Biochem., 1978, 83, p. 606-607).

M.-O. MONNEUSE-DOUBLET, A. OLOMUCKI et J. BUC, *Investigation on the kinetic mechanism of octopine dehydrogenase. A regulatory behavior* (Eur. J. Biochem., 1978, 84, p. 441-448).

C. ORIOL-AUDIT, *Polyamine-induced actin polymerization* (Eur. J. Biochem., 1978, sous presse).

M. PHILIPS, C. ROUSTAN, A. FATTOUM et L.-A. PRADEL, *Yeast 3-phosphoglycerate kinase. Essential arginyl residues at the 3-phosphoglycerate binding site* (Biochim. Biophys. Acta, 1978, 523, p. 368-376).

J. DIOPH et M. OLOMUCKI, *New protein reagents. N-(4-chloromercuriphenyl)-4-chloro-3,5-dinitrobenzamide and its use as a probe of the quaternary structure of yeast alcohol dehydrogenase* (Eur. J. Biochem., 1977, 75, p. 441-445).

J. DIOPOH et M. OLOMUCKI, *Etude des propriétés de l'acide et de l'ester chlorotétrorique en tant que réactifs acétyléniques éventuels des protéines* (Compt. Rend. Acad. Sci., 1977, 284, p. 2293-2296).

J.-P. LAUTÉ et M. OLOMUCKI, *New protein reagents. Synthesis and properties of halogenated maleimides and isomaleimides* (Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem., 1978, 359, p. 211-218).

C. NEGRIÉ, J. BOUHNİK, O. MICHEL et R. MICHEL, *Effects of thyroidectomy on the protein content of rat adrenal cortex mitochondria and microsomes* (J. Steroid Biochem., 1978, sous presse).  
*de la thyroïdectomie sur les propriétés des mitochondries du foie de rat en régénération* (Compt. Rend. Soc. Biol., 1978, 172, p. 38-42).

M. BAUDRY, J.-P. CLOT, V. BOUTROUX et R. MICHEL, *Fixation de la 3,3',5'-triiodo-L-thyronine sur les protéines sériques humaines* (Compt. Rend. Acad. Sc., 1978, Sér. D, 286).

J.-P. CLOT, M. BAUDRY et J. BOUHNİK, *Liver mitochondria in the chloramphenicol-treated rat ; similarities with thyroidectomy* (Biochimie, 1978, sous presse).