

Biochimie cellulaire

M. François GROS, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Nouveaux aspects de la Biologie moléculaire du gène

La Biologie moléculaire connaît depuis quelque temps un étonnant renouveau tant en ce qui concerne nos conceptions sur l'organisation et le fonctionnement des gènes que les techniques de recombinaisons artificielles.

Le cours a donc comporté cette année deux parties : dans la première, nous nous sommes attaché à décrire et à évaluer les données récentes sur la structure fine du matériel chromatinien chez les organismes eucaryotiques supérieurs ; dans la seconde, nous avons traité des techniques dites de « manipulations génétiques » et passé en revue certains des résultats les plus marquants auxquels ces techniques ont conduit.

I. - Données récentes sur la structure de la chromatine

Depuis les premières observations dues à Ollins et à Chambon sur la structure discontinue de la chromatine, structure dite en « collier de perles », et l'isolement par Kornberg des sous-unités, il est désormais établi que le DNA des chromosomes est enroulé autour de petits globules d'histones, les « nucléosomes », dont le diamètre est voisin d'une centaine d'angströms. Chaque nucléosome comporte 8 molécules d'histones, appartenant aux 4 types classiquement décrits : H_{2A} , H_{2B} , H_3 , H_4 , les histones riches en arginine (H_3 , H_4) constituant un assemblage tétramérique central, les histones riches en lysine (H_{2A} , H_{2B}) étant disposées autour du tétramère. La quantité de DNA présent par nucléosome (« repeat » DNA), conçue primitivement comme un segment de longueur constante et voisine de 200 paires de bases, varie en fait dans des proportions assez importantes (140 à 210 paires de bases) selon les espèces ou selon les tissus dans une espèce donnée. Cette situation est liée à ce qu'il existe, à côté d'une quantité fixe de DNA directement au contact de la particule (« core » DNA) — quantité équivalente à 140 paires de bases — du DNA « internucléosomique »

très accessible à l'action des DNases, qui sert plus ou moins de lien entre deux nucléosomes contigus. Selon les cas les nucléosomes peuvent être plus ou moins rapprochés et la longueur du DNA internucléosomique varie en conséquence. La longueur constante du segment constituant le DNA du core est imposée par la géométrie du nucléosome. De fait, des travaux plus récents révèlent que cette particule loin d'être globulaire a la forme d'un cylindre que la microscopie électronique permet d'entrevoir comme composé de deux disques épais superposés et de dimensions équivalentes. Le segment du « core DNA » est de fait enroulé deux fois autour du cylindre, chaque spire étant probablement au contact d'un des deux disques (données dues à l'école de Klug). L'ensemble du nucléosome (spires de DNA et cylindre) admet une symétrie binaire et constitue par conséquent une « diade ». La symétrie à laquelle répond l'enroulement du DNA en 2 spires superposées est confirmée par des expériences de digestion prolongée des nucléosomes par la DNase du staphylocoque après avoir marqué les extrémités 5'P présentes aux extrémités sur les 2 brins complémentaires de la double hélice. On a des raisons de penser que l'indice de courbure du DNA est constant et que les « coudes » dont l'existence avait été initialement postulée par F. Crick font défaut. L'hydrolyse du « core DNA » en des segments dont les longueurs sont des multiples de 10 paires de bases pourrait s'expliquer par les caractéristiques mêmes d'une double hélice au contact d'un globule d'histone, puisque le pas de l'hélice correspond à 10 paires de bases.

L'existence d'une symétrie d'ordre 2 est également confirmée par l'observation au microscope électronique (Gross Belard, Oudet et Chambon) de particules ayant des dimensions équivalentes à des 1/2 nucléosomes lorsque la chromatine a été soumise à certains traitements salins. Dans quelle mesure la capacité que présentent les nucléosomes à s'ouvrir et à se refermer est-elle mise à profit au cours de la replication ou de la transcription ? Ce point est loin d'être établi.

Une des étapes les plus marquantes dans l'analyse de la conformation des chromosomes réside probablement dans la mise en évidence par Bradbury et par Klug et collaborateurs des structures de nucléosomes « surcompactées », appelées solénoïdes. De telles structures sont constituées par un arrangement de nucléosomes en « organisations superspiralées », chaque tour de spire renfermant 6 nucléosomes parfaitement contigus, liés les uns aux autres par des molécules d'histones H_1 . L'ensemble se présente comme un gros cylindre creux de 300 Å de section. L'existence de fibrilles chromosomiques de 100 et 300 Å d'« épaisseur » a, de longue date, été rapportée lors des études de cytologie ultrastructurale et les études de Klug apportent ainsi un modèle moléculaire précis rendant compte de ce fait. Le degré de « compaction » du DNA dans un solénoïde à 6 nucléosomes est d'environ 40.

Il est probable que l'extraordinaire « compaction » du matériel génétique à la prophase (plusieurs centaines de fois) est due à ce que les solénoïdes sont repliés à leur tour en des arrangements se présentant comme des boucles géantes projetées de chaque côté d'un grand axe principal ; ces boucles géantes dont la section est constituée par des empilements de solénoïdes pourraient avoir des dimensions variables ; elles seraient sans doute les équivalents des bandes d'hétérochromatine dans les chromosomes polyténiques des glandes salivaires des diptères. Des travaux récents au cours desquels on a examiné par microscopie électronique la « morphologie » de chromosomes débarrassés de leurs histones par des traitements ménagés indiquent en effet que le DNA paraît organisé en boucles géantes reliées à un axe central, l'arrangement étant maintenu par des protéines « non histones » (NHP) appelées « scaffolding proteins ».

A côté de ces importants progrès dans la connaissance des paramètres structuraux de la chromatine, des données non moins intéressantes ont été obtenues dans l'étude de la replication et de la transcription des gènes chez les eucaryotes supérieurs.

Tout d'abord, par double marquage isotopique (^{14}C , ^{15}N) Felsenfeld et ses collaborateurs ont montré qu'au cours de la replication les histones néosynthétisées ne se mélangent pas aux histones préexistantes, chaque histone préexistante demeurant intégrée au sein d'un même nucléosome, ce qui plaiderait pour un modèle conservatif. S'il y a ouverture des nucléosomes au cours de la replication il est donc probable que les histones préalablement associées se « rejoignent » pour reformer un nucléosome complet une fois repliqué chacun des 2 brins de la double hélice.

Mais c'est au niveau des mécanismes d'expression que les observations récentes apportent, nous semble-t-il, les éclairages les plus marquants. L'ensemble des données peut être résumé ainsi :

a) Si l'on considère les gènes susceptibles d'être transcrits en RNA messagers (gènes de « structure »), on peut avancer que, contrairement à certaines prévisions, les gènes activés dans un noyau eucaryotique ne sont pas débarrassés de leur complément en histones. La digestion prolongée de noyaux provenant d'érythroblastes de poulet, cellules synthétisant la globine en très grande abondance, révèle que les « gènes globine » se retrouvent dans des segments de DNA attachés à des nucléosomes.

b) En revanche — et ce point est d'une importance particulière — les gènes actifs ou préalablement activés pendant l'ontogenèse d'un tissu affichent une sensibilité beaucoup plus marquée vis-à-vis de la DNase I que les gènes inactifs. Ces résultats ont été très clairement établis par les travaux de Weintraub et Groudine d'une part, Felsenfeld d'autre part. Ainsi le DNA présent sur les nucléosomes de segments génétiques en cours de trans-

cription ou ayant été préalablement transcrits existe dans un état conformationnel particulier. Des travaux récents attribuent cette propriété soit à une acétylation préférentielle des histones H_3 et H_4 dans les segments activés, soit à l'influence de certaines protéines non histones. Weintraub et Weisbrod, dans des expériences très élégantes, montrent que certaines protéines NHP, sans doute spécifiques, démarqueraient les phénomènes de transcription au niveau des promoteurs ; d'autres protéines non spécifiques (HMG_2) servant d'éléments de propagation assureraient l'activation du segment chromatinien sur toute sa longueur.

c) Les gènes ribosomiques des eucaryotes, contrairement aux gènes de structure, se dépouillent de leurs nucléosomes *avant* que la RNA polymérase spécifique de ces gènes n'initie son activité de copiage.

II. - *Recombinaisons artificielles. Manipulations génétiques*

Un autre domaine en pleine expansion est celui des « manipulations génétiques ». Il s'agit d'une technologie nouvelle issue de la génétique moléculaire et qui consiste à découper de façon enzymatique les chromosomes d'une cellule dite « donneuse d'information », à les souder à des éléments génétiques capables de replication autonome (plasmides, bactériophages) encore appelés « vecteurs », et à transférer les recombinants artificiels ainsi créés dans des cellules « receveuses ». Le but visé est d'obtenir l'« *expression* » — sous la forme d'un RNA messenger et d'une protéine — d'un gène « étranger » au sein d'une cellule qui ne comportait pas ce gène dans son patrimoine héréditaire.

Après une introduction sur les éléments principaux de cette technologie (nature des vecteurs, propriétés des enzymes de restriction, modes d'obtention des gènes ou segments génomiques insérables dans les vecteurs, méthodes de clonage et de repérage des clones), nous avons analysé quelques-uns des résultats parmi les plus saillants qui émanent de ces nouvelles approches.

a) *Système « globine » et mosaïque génétique*

Les travaux dus aux équipes de B. Mach, F. Rougeon, P. Kourilsky, d'une part, Flavell, et P. Leder, d'autre part, ont permis des avancées extrêmement importantes dans l'étude des gènes de la globine chez les mammifères, grâce aux techniques de clonage. Le clonage permet en effet d'obtenir des quantités très importantes de fragments chromosomiques provenant de cellules de souris, lapin ou homme, qui sont enrichis en gènes de globine.

Si l'on procède à la cartographie physique de ces segments « clonés » et que l'on compare les segments obtenus après digestion par des enzymes de

restriction à ceux dérivant du clivage du CDNA globine on aboutit à la conclusion surprenante que *dans les chromosomes* la chaîne β de la globine, par exemple, n'est pas formée d'une séquence *continue* de nucléotides mais est une *mosaïque* de segments « codants », appelés « exons », séparés par des segments de DNA non codants, appelés « introns ». Cette discontinuité génétique a depuis lors été observée dans tous ou presque tous les systèmes génétiques étudiés.

Ainsi l'organisation des gènes dans les chromosomes des eucaryotes diffère profondément de celle observée chez les microorganismes ou les bactériophages.

Bien que l'on ne possède pas encore d'explication raisonnable à cet état de choses, on pense aujourd'hui que les « exons » coderaient pour des « domaines » fonctionnellement distincts d'une même protéine.

Au cours de l'expression du gène β de la globine, l'ensemble des « exons » et des « introns » est cotranscrit en un RNA nucléaire géant. Ce dernier subit des remaniements conduisant à l'élimination des segments de RNA correspondant aux « introns », puis à la recombinaison des segments de RNA des régions de codage. Le résultat est l'exportation d'un RNA messenger dont l'information est colinéaire de celle de la protéine. Ce mécanisme d'« épissage » paraît s'appliquer à l'expression de tous les gènes en « mosaïque » étudiés jusqu'ici. Les techniques de clonage des gènes globine ont notamment permis de préciser les dispositions topographiques des segments γ et δ chez l'homme. Elles ont enfin rendu possible — par les sondes moléculaires qu'elles procurent — des méthodes de diagnostic précoce de l'anémie falciforme et de l' α -thalassémie.

Systèmes « somatostatine » et « insuline »

Grâce aux techniques de recombinaisons génétiques, les gènes de deux hormones, la *somatostatine* et l'*insuline*, ont pu être transférés dans des cellules d'*E. coli* qui les ont traduits en protéines. Ainsi le gène de la somatostatine a-t-il pu être synthétisé chimiquement selon la technique de Khorana puis transféré dans *E. coli* grâce à un vecteur plasmidien (Goodman). Le gène de l'insuline a été reconstitué par copiage du RNA messenger extrait d'un insulinome de rat au moyen de la transcriptase réverse. Le CDNA une fois soudé artificiellement au gène « pénicilline » du plasmide pBR322 a été transféré dans *E. coli*. Une protéine *hybride*, pénicilline-insuline, est sécrétée par la souche ainsi « transfectée ». L'insuline représente 0,1 % des protéines totales (W. Gilbert).

Système ovalbumine

Une expérience de même nature a été réalisée pour le gène de l'ovalbumine de poule. Le CDNA ovalbumine soudé au gène lactose du plasmide

pBR322 a été transféré dans une souche d'*E. coli*. Par une technique de radioimmuno-essai on peut démontrer l'expression de l'ovalbumine après induction de l'opéron lactose par l'isopropylthiogalactoside. La production d'ovalbumine par *E. coli* est considérable, voisine de 1 % des protéines totales ; la protéine est sécrétée (Mercereau-Puijalon, P. Kourilsky).

Des résultats non moins spectaculaires ont été enregistrés dans l'étude de grands segments chromosomiques incluant la région codant pour l'ovalbumine, segments produits par l'enzyme de restriction « Hha ». L'étude de ces longs segments clonés a permis aux groupes de Chambon et de Kourilsky d'analyser la distribution de segments codants et, dans certains cas, d'en établir la séquence. La région ovalbumine, dont l'expression est sous le contrôle des stéroïdes, comprend 7 « exons » séparés par 6 « introns ». Après l'injection de stéroïdes un messenger géant est cotranscrit qui subit l'épissage pour être traduit en ovalbumine protéine de 600 résidus.

Les séquences des régions en bordure des « introns » et des « exons » ont été établies dans les groupes de P. Chambon et de O'Malley ; on n'y décèle aucune particularité se traduisant par la formation de structure d'appariements en « épingles à cheveux », comme cela avait été postulé. En revanche, certains « motifs » baptisés « séquences prototypes » serviraient d'éléments de reconnaissance aux nucléases intervenant dans le processus d'épissage.

Système des immunoglobulines

La diversité des anticorps chez un mammifère ne peut s'expliquer que par une combinatoire de régions génétiques distinctes, engendrant des assortiments codant pour les portions constantes et variables des chaînes légères et lourdes dont sont constitués les anticorps.

Grâce à des techniques de recombinaisons génétiques et de clonage, W. Gilbert d'une part et Tonegawa d'autre part dans le groupe de N. Yerne, ont établi la disposition topographique des régions codant pour les portions variables et constantes d'une chaîne légère dans les myélomes ou plasmocytomes murins.

Le résultat néanmoins le plus remarquable est que les segments codant pour les portions constante et variable (segments en mosaïque comprenant divers « introns ») sont *physiquement séparés* dans des lymphoblastes embryonnaires mais se trouvent pratiquement contigus dans les cellules productrices d'anticorps des myélomes (encore que disjoints par un « introns » de 1 850 paires de bases). Cette *translocation* qui accompagne l'ontogenèse du système immunocompétent paraît un phénomène propre à ce système cellulaire. Elle explique, sur des bases moléculaires très précises, comment

le réassortiment entre des gènes pour diverses régions variables et un, ou quelques, gène(s) de région constante permet de créer un secteur génomique continu, cotranscrit en un messenger codant après épissage pour une chaîne d'immunoglobuline particulière.

F. G.

Un certain nombre de séminaires se rapportant aux principaux thèmes du cours ont été donnés, dont voici les titres :

SÉMINAIRES

M. F. ROUGEON (Paris), *Mosaïque génétique : le système IgG.*

M. P. KOURILSKY (Paris), *Mosaïsme génétique : le système ovalbumine.*

M. N. AFFARA (Paris), *Régulation nucléosomique et post-transcriptionnelle dans l'induction des cellules de Friend.*

M. G. CONTESSE (Paris), *Activation et inactivation génétiques liées aux transpositions chromosomiques.*

M^{me} D. PAULIN (Paris), *Système SMA et régulation génétique.*

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

BIOCHIMIE CELLULAIRE

Recherches sur la différenciation du neuroblastome murin C1300

Nos travaux sont relatifs à l'étude des mécanismes de l'expression génétique qui dirigent le devenir d'une cellule neuronale au cours du processus de différenciation.

Parmi les événements moléculaires produits par cette expression génétique, nous avons retenu ceux qui président à l'évolution des populations d'antigènes de surface, des RNA messagers, ou de marqueurs protéiques particuliers (tubuline, 14-3-2, acétylcholinestérase, tyrosine hydroxylase, facteur de croissance du neurone (« NGF »)).

1. *Antigènes de surface : apport des antisérums anti-neuroblastome dans l'étude des composants membranaires des cellules neuronales*

(Y. BERWALD-NETTER, A. KOULAKOFF, E. HOUZET.)

L'objectif général de notre recherche est d'étudier les structures membranaires de la cellule nerveuse, de suivre leur évolution au cours du développement ontogénique et d'examiner leur implication dans des fonctions neuronales. Une approche immunologique, réalisée par le biais des antisérums xénogéniques (de lapin) contre une lignée clonale de neuroblastome C1300, a été adoptée pour l'étude des antigènes associés à la membrane des neurones. La mise en jeu d'une batterie de lignées cellulaires aux phénotypes variés (neuronal, glial, fibroblastique, lymphoïde) d'une part, des tissus correspondants et des cultures primaires à partir du système nerveux central et périphérique, d'autre part, a permis d'établir le *profil global des antigènes membranaires* exprimés par C1300 et de mettre en évidence un certain nombre d'antigènes communs aux tissus nerveux fœtal et adulte. Nous avons déterminé trois classes d'antigènes communs au neuroblastome et au cerveau de souris. L'un de ces antigènes, nommé NbI/NH, est un nouvel antigène de différenciation, commun aux thymocytes et au cerveau. Il s'agit d'un composant membranaire différent du Thy-1. Les deux antigènes se distinguent, comme nous l'avons démontré, par leur distribution tissulaire, leur expression temporelle dans le cerveau au cours de l'ontogenèse, le manque de blocage réciproque par des anticorps respectifs et, enfin, par leur « capping » indépendant sur les thymocytes.

Une deuxième classe d'antigène(s) (NbII/NH) est partagée par des sous-populations immunoglobuline négatives du système hémopoïétique fœtal et adulte et de cerveau de souris. Sa quantité augmente au cours du développement. De tels antigènes sont détectables par des antisérums xénogéniques anti-cerveau total de l'homme, du rat et de la souris. Dans le système hémopoïétique, les cellules impliquées semblent être principalement les cellules souches et précurseurs ; l'association cellulaire au sein du système nerveux n'est pas connue. On mesure l'intérêt d'une telle recherche par l'application possible des anticorps spécifiques dans des études fonctionnelles des cellules porteuses des antigènes correspondants ainsi que dans la purification éventuelle de ceux-ci.

La troisième classe (NbIII/N) est spécifique des neurones, comme l'a montré l'immunofluorescence sur cultures primaires des ganglions périphériques — sympathiques et rachidiens. Le bilan de l'activité cytotoxique globale vis-à-vis des cellules dissociées de cerveau fœtal de 17-18 jours embryonnaires indique que environ 30 % sont dus au NbI/NH, 10-20 % au NbII/NH et que environ 50 % sont spécifiques du neurone et correspondent au NbIII/N. Seul le NbI/NH est exprimé par certaines glia.

2. Mécanismes de transcription

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

Il était intéressant d'analyser la complexité de séquences des poly(A)⁺RNA polysomiques du cerveau global de souris, en suivant très précisément le protocole expérimental utilisé pour l'analyse du neuroblastome. Les 12 000 séquences de messagers ainsi mises en évidence montrent que la complexité du cerveau n'est pas significativement plus élevée que celle du neuroblastome (7 000 séquences). Ce résultat est contraire à l'hypothèse selon laquelle la cellule nerveuse exprimerait une information génétique particulièrement élevée. Les très fortes complexités mesurées par titration du DNA non répétitif (Bantle et coll.) ne reflètent probablement que la forte hétérogénéité cellulaire de l'organe.

L'analyse d'une aire spécifique, le cortex, a montré, par rapport au cerveau total, une modulation différentielle dans le niveau d'expression génétique.

3. Expression génétique de la tubuline

(C. JEANTET, M.-M. PORTIER, A. WOLFF, B. EDDÉ, D. CHILLET, C. SAHUQUILLO.)

L'existence de mécanismes de modulation de la synthèse de différentes formes d'un même type protéique semble accompagner le processus de différenciation cellulaire.

Nous avons recherché les formes de la tubuline connues pour présenter deux sous-unités, α et β . L'analyse bidimensionnelle de la tubuline, intégrant les propriétés isoélectriques et le poids moléculaire, nous a permis de différencier 9 formes protéiques.

La signification biologique de ce pluralisme moléculaire nous conduit à déterminer si ces formes sont le produit de différentes espèces de RNA messagers ou résultent de modifications post-traductionnelles d'un nombre plus réduit de ces mRNAs. Ainsi nous analysons actuellement les produits de traduction dans le système *in vitro* de lysats de réticulocytes des RNA poly A⁺ isolés de cerveaux et séparés par un gradient dénaturant de formamide.

Parallèlement, nous étudions l'évolution des différentes formes de la tubuline et de ses protéines d'assemblage au cours de la différenciation morphologique du neuroblastome.

4. Expression génétique de la protéine 14-3-2, émolase spécifique du neurone

(L. LEGAULT, A. MARKS, Y. ZEITOUN, N. LAMANDÉ, C. SAHUQUILLO.)

L'analyse des mécanismes moléculaires qui règlent l'expression quantitative et qualitative de la protéine 14-3-2 a été faite au niveau de cultures cellulaires homogènes de neuroblastomes. La protéine immunologiquement détectable s'accumule dans les cellules en voie de différenciation terminale. Cette accumulation s'explique par un accroissement du taux de synthèse de la protéine mais il n'a pas encore été établi si une stabilisation de la molécule intervient également dans ce phénomène.

Il convient de préciser si le changement du taux de synthèse de la protéine est dû à un mécanisme de nature transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Pour ce faire, nous déterminons le niveau de l'ARN messager cytoplasmique de la protéine traductible *in vitro*, présent dans des extraits de cellules différenciées ou pas. La titration de toutes les séquences spécifiques présentes de cet ARN nous conduit à préparer le DNA complémentaire correspondant. Une telle préparation nous permettra de procéder au clonage du gène de l'émolase. Actuellement, par des méthodes de purification, nous essayons d'obtenir une population de mRNA enrichie en messager spécifique de la 14-3-2.

Nous avons cherché, par ailleurs, à déterminer l'évolution des formes isozymiques de l'émolase au cours de la différenciation neuronale. Cette évolution, comme dans l'ontogenèse du cerveau, se retrouve dans des cellules en culture en voie de différenciation.

5. Expression de l'acétylcholinestérase

(D. LAZAR, C. SAHUQUILLO.)

En collaboration avec le groupe de J. Massoulié, à l'Ecole Normale Supérieure, nous avons établi que les trois formes globulaires de l'acétylcholinestérase (AChE), G1 (monomérique), G2 (dimérique) et G4 (tétramérique) sont exprimées par les cellules de neuroblastome (clones N18TG2 et N1A103), ou dérivées du neuroblastome par hybridation somatique avec des neurones sympathiques (T28) ou le gliome C6 (NG108-15). Par contre, les formes asymétriques comportant un élément collagénique sont absentes et nous nous proposons d'examiner si elles apparaissent en coculture avec des neurones de la moelle épinière.

Au cours de l'induction de l'AChE, G4 s'accumule préférentiellement et G1 semble être son précurseur métabolique. Cette maturation de l'enzyme

en culture rappelle celle observée *in vivo* au cours du développement du cerveau. Nous avons pu montrer que G4 est associé à la membrane plasmique alors que la fraction particulaire de G1 (65 %) est associée à des membranes internes. Une variante soluble de chaque forme est sécrétée dans le milieu de culture et les formes G1, G2 et G4 sécrétées possèdent des propriétés physicochimiques significativement différentes des formes correspondantes associées aux cellules. La sécrétion d'AChE au cours de l'induction est quantitativement neutre (la proportion relative des formes dans le pool sécrété reflète celle du pool cellulaire).

L'augmentation préférentielle de la forme de surface G4 peut être entièrement découplée de l'expression de la différenciation morphologique (elle s'exprime en suspension, dans des cellules traitées par un agent qui bloque les mitoses sans permettre l'extension des neurites, de même que chez un clone « neurites-moins », N1A103) et semble constituer un signal précoce de la maturation de la membrane plasmique.

Le neuroblastome constitue ainsi un modèle très utile pour étudier les diverses étapes du contrôle de la biosynthèse des formes globulaires, cellulaires et sécrétées, de cet enzyme physiologiquement essentiel. Des expériences en cours employant des inhibiteurs de la transcription et de la glycosylation devraient apporter des informations intéressantes à ce sujet.

6. Etude de la régulation de la tyrosine hydroxylase

(J. THIBAUT, R. DRISSI, S. EL MESTIKAWY.)

Nous avons purifié la tyrosine hydroxylase (TH) à partir d'une tumeur transplantable de rat, le phéochromocytome. La protéine purifiée présente un poids moléculaire égal à 150 000 et se dissocie dans le lauryl sulfate de sodium en sous-unités de PM 60 000. Un antisérum préparé à partir de cette protéine s'est pourtant révélé être complexe et donner au moins trois arcs de précipitation en immuno-électrophorèse. Des études sont entreprises pour voir si cette protéine est phosphorylable comme celles porteuses de la même activité, isolées soit du cerveau, soit des glandes surrénales.

7. Synthèse *in vitro* du « NGF »

(J. THIBAUT, D. VIDAL.)

Le « NGF » est synthétisé par la glande salivaire des souris mâles. La purification des RNA poly A⁺ à partir de cette glande a conduit à une population de messagers traduisibles *in vitro* par le germe de blé et le lysat

de réticulocytes. 9 protéines majeures sont facilement repérables sur gel SDS. Une bande majeure est absente dans les protéines synthétisées à partir des RNA poly A⁺ des glandes salivaires des souris femelles. Malgré des techniques très fines d'immunoprécipitation, il n'a pas été possible de caractériser le « NGF » dans ces fractions.

En collaboration avec le D^r AFFARA de l'Institut Pasteur, nous avons entrepris l'étude des populations de mRNA par des expériences d'hybridation croisée entre RNA provenant des glandes salivaires des deux sexes et leurs cDNA. Les résultats confirment ceux de la synthèse *in vitro* : huit familles sont majoritaires.

ENZYMOLOGIE

Le Groupe de recherche du C.N.R.S. n° 6, devenu l'Equipe de recherche du C.N.R.S. n° 230, a poursuivi des travaux sur la structure et le mécanisme d'action des protéines enzymatiques et contractiles.

I - OCTOPINE DÉSHYDROGÉNASE

A - *Caractérisation des formes multiples*

Les deux formes majeures de l'enzyme se différencient par leurs charges à l'état natif et dénaturé, et par leur stabilité. Les tests immunologiques par immunodiffusion ont montré des réactions croisées. Les tentatives d'opérer la transformation d'une forme en l'autre ont échoué. Afin de vérifier si ces formes sont des isoenzymes, une détermination des séquences de leurs extrémités N-terminales a été entreprise.

(M.-O. MONNEUSE, F. LEFÉBURE et A. OLOMUCKI.)

B - *Approche chimique de l'étude du mécanisme d'action de l'enzyme*

La technique du marquage par affinité du résidu histidyle essentiel a été utilisée pour obtenir des renseignements sur le mécanisme de la catalyse dans lequel l'histidine serait impliquée. Ce mécanisme semble être commun à la majorité des déshydrogénases à coenzyme pyridinique.

(D.B. PHO et A. OLOMUCKI.)

II - ARGININE KINASE

Les résultats des nombreuses études faites à l'aide de la résonance magnétique du proton et du phosphore sont en faveur d'un mécanisme de catalyse acide-base à travers un système de relais de charge impliquant les histidines.

(D.B. PHO, M. ROUX, R. KASSAB et L.-A. PRADEL.)

III - ACTINES MUSCULAIRES ET CYTOPLASMIQUES

A - La polymérisation de l'actine de plaquettes sanguines humaines est étudiée comparativement à celle de l'actine sarcomérique, en fonction des facteurs ioniques et de la température.

(F. LANDON, M. COUÉ et A. OLOMUCKI.)

B - La recherche des facteurs susceptibles de modifier l'état de polymérisation de l'actine a été menée dans deux directions :

1) L'effet inducteur de polymérisation de l'actine sarcomérique exercé par les polyamides biologiques a été confirmé avec les actines cytoplasmiques. Ceci a conduit à l'hypothèse que les polyamides pourraient jouer un rôle important *in vivo* dans la formation de l'anneau contractile.

(C. ORIOL.)

2) La β -actinine répandue assez largement dans les muscles et les cellules non-musculaires a été décrite dans la littérature comme ayant la propriété d'inhiber *in vitro* la polymérisation de l'actine. Les résultats de l'étude effectuée au laboratoire n'ont pas permis de situer la β -actinine ni en tant qu'inhibiteur de la polymérisation de l'actine G ni en tant que facteur de dépolymérisation de l'actine F.

(F. LANDON, C. ORIOL et A. OLOMUCKI.)

C - L'étude du mode de régulation de l'activité de la Mg^{2+} -ATPase de l'actomyosine de la plaquette semble être en faveur de la coexistence de deux systèmes de régulation par le calcium, avec toutefois une prédominance de celui lié à la myosine. Une fraction protéinique capable d'inhiber l'actomyosine a été extraite de la plaquette. Sa purification et son identification sont en cours.

(C. HUC, F. THOMÉ, M. COUÉ et A. OLOMUCKI.)

IV - CRISTALLOGENÈSE DES PROTÉINES

1) Des cristaux d'octopine déshydrogénase sont actuellement fabriqués de façon très reproductible et leur croissance est très prometteuse.

(C. DUBORD et A. OLOMUCKI.)

2) L'étude systématique de la cristallogenèse de l'actine musculaire native dans divers milieux apolaires est en cours.

(C. ORIOL et C. DUBORD.)

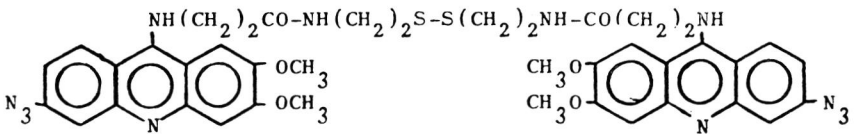
3) Des essais de cristallogenèse de l'actine de plaquette sanguine ont été entrepris.

(A. OLOMUCKI et C. DUBORD.)

4) L'étude aux rayons X de cristaux d'arginine kinase infiltrés de Pt et Mg s'est poursuivie à l'Institut Pasteur et à Lure (J. JANIN, M. GODET, M. RE-NAUD, R. FOURME). L'enzyme est préparé à Montpellier (L.-A. PRADEL) et la cristallogenèse a lieu au laboratoire du Collège de France (C. DUBORD).

CHIMIE BIORGANIQUE

L'équipe de M. M. OLOMUCKI a synthétisé un réactif original de pontage des protéines avec les acides nucléiques. Ce composé, conçu de manière que son action commence par un attachement sur ces derniers, comprend les éléments structuraux suivants : 1) un noyau acridine destiné à s'intercaler dans un premier temps sur l'acide nucléique ; 2) un substituant photoactif azide sur le fragment acridine, permettant de l'attacher, dans un deuxième temps, sur le site de fixation ; 3) une chaîne latérale de longueur variable terminée par une fonction thiol, pouvant être liée réversiblement aux groupements -SH d'une protéine par oxydation conduisant à un disulfure.



La synthèse du réactif (isolé sous forme de disulfure), le bis-[N-thio-2 éthyl (diméthoxy-2,3 azido-6 acridyl-9) amino-3 propionamide chlorhydrate] ou AAT, bien que comportant 10 étapes, a été élaborée de façon à pouvoir être exécutée rapidement avec un rendement global satisfaisant. Des tests modèles ont confirmé que le réactif AAT est bien capable de ponter des tRNA ou mRNA avec des protéines et par conséquent convient par exemple pour l'étude de la structure des ribosomes ou de différents autres systèmes composés de protéines et d'acides nucléiques. On peut également envisager son étude en tant que réactif de bis-intercalation dans le DNA. Enfin, ses éventuelles propriétés pharmacologiques sont à l'étude.

ENDOCRINOLOGIE

Les recherches sur la biochimie des hormones thyroïdiennes et sur les propriétés des mitochondries ont été poursuivies.

Métabolisme et mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes

Les activités métaboliques des sujets âgés sont comparables à celles que l'on observe dans les cas d'hypothyroïdie légère chez l'homme. Nous avons trouvé que les concentrations sériques de thyroxine (T_4) et de triiodothyronine (T_3) chez des rats de 2 ans sont inférieures à celles des rats de 2 mois, alors que la triiodothyronine inverse (rT_3) n'est pas modifiée. Les activités des mitochondries hépatiques des rats âgés se rapprochent de celles observées chez les animaux jeunes thyroïdectomisés. La diminution du taux de T_3 circulante rend compte en partie des changements métaboliques caractéristiques de la sénescence.

Nous avons étudié l'effet de divers médicaments sur le métabolisme de la T_4 . Après traitement par la dexaméthasone, on constate chez le rat une faible diminution de la T_4 avec augmentation de la rT_3 , mais sans modification de la concentration de T_3 . Ces faits s'expliquent par une activation spécifique des systèmes de désiodation microsomaux de T_4 vers rT_3 . Le phénobarbital provoque une diminution à la fois de la T_4 et de la T_3 sériques sans modification de la rT_3 . Ces résultats s'expliquent par une rétention hépatique de T_4 sous l'effet du barbiturique sans que l'activité du système désiodant T_4 soit affectée.

Des recherches ont été réalisées en vue d'examiner les effets de T_3 sur les mitochondries hépatiques en relation avec l'action hormonale sur les systèmes de synthèse protéique mitochondrial et nucléocytoplasmique. Les résultats montrent que T_3 a un effet précoce et préférentiel sur le système de synthèse protéique mitochondrial et sur l'activité de certaines enzymes de la membrane interne.

Mécanisme des hydroxylations du cholestérol

La thyroïdectomie provoque une diminution de la vitesse de la corticostéroïdogenèse. Les travaux entrepris ont eu pour but d'étudier chez le rat les effets de l'hypothyroïdie sur les hydroxylations du cholestérol. La thyroïdectomie entraîne une diminution de l'activité de la transdéshydrogénase qui assure le transfert des équivalents réducteurs du NADH vers le NADP donnant du NADPH qui fournit l'énergie nécessaire aux hydroxylations mitochondriales. Les vitesses d'hydroxylation du 20 α — et du 22 R-hydro-

xycholestérol sont également diminuées par le défaut d'hormones thyroïdiennes. La thyroïdectomie ralentit la vitesse de l'étape initiale de la synthèse des stéroïdes de la corticosurrénale par suite d'une réduction de la « proton motive force » mitochondriale.

Des travaux similaires ont été réalisés avec des mitochondries isolées du placenta humain à terme. La vitesse de la consommation d'oxygène est augmentée en présence de 20 α — et de 22 R-hydroxycholestérol, mais non en présence de 22 S-hydroxycholestérol, ce qui implique que le système hydroxylant est stéréospécifique. Le mécanisme des hydroxylations des mitochondries placentaires est semblable à celui mis en évidence au niveau des mitochondries de la corticosurrénale.

MANIFESTATIONS SCIENTIFIQUES, COLLOQUES

Le Professeur F. GROS a participé au colloque organisé en juin 1978 à Paris par l'Organisation Internationale des Techniques Biocellulaires et y a prononcé une conférence « Différenciation somatique des cellules musculaires en culture ».

Il a également, sur invitation de l'Institut Salk à La Jolla (U.S.A.), prononcé deux conférences sur la différenciation somatique (juillet 1978).

Dans le cadre du Colloque de Biologie Moléculaire organisé à l'Institut Pasteur d'Athènes, il a donné une conférence sur la myogenèse et la pathologie musculaire (février 1979).

Deux conférences ont également été prononcées sur le « Génie biologique et ses perspectives », l'une au palais de l'U.N.E.S.C.O. (conférence sur les Nouvelles Techniques), l'autre à l'I.F.P.

*

**

M. B. CROIZAT a donné des conférences au Collège de France et à l'Institut Pasteur (avril 1979), et au Centre de Neurochimie de la Faculté de Médecine de Strasbourg (mai 1979).

M^{me} L. LEGAULT a participé au Colloque de la D.G.R.S.T. dans le cadre du thème : « Biologie de la reproduction et du développement », à Port Bail (février 1979).

M. D.B. PHO a présenté avec M^{me} ROUX, M^{lle} L.-A. PRADEL, MM. R. KASSAB et N.v. THOAI une communication au 4th International Meeting on NMR

Spectroscopy, Université de York (Angleterre), en juillet 1978, et à la 3^e Table Ronde Internationale « Nucléosides, Nucléotides et Applications biologiques », à Montpellier (octobre 1978).

M^{me} A. OLOMUCKI a présenté une communication orale au 4^e Colloque Annuel « Biologie et Fonction du myocarde », à Rouen (octobre 1978). Elle a donné une conférence à l'Hôpital Lariboisière (Prof. J.-P. Caen) « Actine et myosine de la plaquette sanguine », et une autre à l'Ecole Polytechnique, Palaiseau (Prof. J.-P. Waller) « Motilité cellulaire, protéines contractiles et actine de plaquette sanguine humaine ».

M^{me} C. ORIOL a donné une conférence à l'Hôpital Lariboisière (D^r B. Swynghedauw) « L'actine dans la division cellulaire ».

M. M. OLOMUCKI a participé à la 8^e réunion du « Groupe d'Etudes Structure-Activité » à Bordeaux (avril 1978), au colloque sur les « Mécanismes de Réparation du DNA » à Roscoff (mai 1978), à la réunion du « Groupe Peptides » à Pont-à-Mousson (juin 1978), à la 3^e Table Ronde Internationale sur les « Nucléosides, Nucléotides et Applications Biologiques » à Montpellier (octobre 1978), au F.E.B.S. Special Meeting on Enzymes à Dubrovnik (avril 1979) et à l'Ecole d'été « Structure-Fonction Relationship in Biopolymers » à Costagrande, Italie, où il a présenté une conférence (juillet 1978). Il a donné des conférences à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire à Strasbourg (novembre 1978), au Département de Biologie du C.E.A. à Saclay (mars 1979) et au Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik à Berlin (avril 1979).

MM. J. BOUHNİK, J.-P. CLOT et M^{lle} C. NÉGRÉ ont présenté des communications au 7^e Congrès International de Pharmacologie (I.U.P.H.A.R.), Paris (juillet 1978).

M^{lle} C. NÉGRÉ a présenté une communication au 9^e Congrès de l'Association Européenne de Recherches sur la Thyroïde (E.T.A.), Berlin (septembre 1978).

M. R. MICHEL a donné une conférence à la Faculté de Médecine de Caracas et a présenté une communication au 9^e Congrès Panaméricain d'Endocrinologie, Quito (décembre 1978).

PUBLICATIONS

Y. BERWALD-NETTER et A. KOULAKOFF, *The immune response to blastic and differentiated mouse neuroblastoma cells. A study of surface antigens*

(in *Protides of the biological fluids : tumor associated antigens, XXVIIIth Annuals Colloquium, Brussels, 1979*).

A. FELSANI, F. BERTHELOT, F. GROS et B. CROIZAT, *Complexity of poly-somal polyadenylated RNA in undifferentiated and differentiated neuroblastoma cells* (*Eur. J. Biochem.*, 1978, 92, p. 569-577).

B. CROIZAT, F. BERTHELOT, A. FELSANI et F. GROS, *Complexity of poly-somal polyadenylated RNA in mouse whole brain and cortex* (*FEBS Lett.*, sous presse).

A. BAICI, R. JOPPICH-KUHN, P.L. LUISI, A. OLOMUCKI, M.-O. MONNEUSE-DOUBLET et F. THOMÉ-BEAU, *Fluorescence properties of thio-NADH and of its complex with octopine dehydrogenase* (*Eur. J. Biochem.*, 1978, 83, p. 601-607).

C. ORIOL-AUDIT, *Polyamine-induced actin polymerization* (*Eur. J. Biochem.*, 1978, 87, p. 371-376).

M. PHILIPS, D.B. PHO et L.-A. PRADEL, *An essential arginyl residue in yeast hexokinase* (*Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 566, p. 296-304).

A. OLOMUCKI, F. THOMÉ-BEAU et C. HUC, *Human platelet actin and calcium control of actin activated myosin ATPase in platelets* (*7th European Conference on Muscle and Motility, Varsovie, 1978, Abstracts p. 111*).

A. OLOMUCKI, F. LANDON et C. ORIOL, *Cytoplasmic and muscular actins : structural differences between polymerizable and non-polymerizable forms* (*6th International Biophysics Congress, Kyoto, 1978, Abstracts p. 304*).

C. ORIOL-AUDIT, *Actin polymerization induced by various biological compounds* (*6th International Biophysics Congress, Kyoto, 1978, Abstracts p. 229*).

M.-O. MONNEUSE, F. LEFÉBURE et A. OLOMUCKI, *Separation and properties of two forms of octopine dehydrogenase of *Pecten maximus** (*FEBS Special Meeting on Enzymes, Dubrovnik, 1979, Abstract S7-6*).

M. OLOMUCKI, J. DIOPOH et M. KEITA, *The chloro-o,o'-dinitrophenyl group, a new chromogenic protein modifier* (*FEBS Special Meeting on Enzymes, Dubrovnik, 1979, poster S7-40*).

J. DIOPOH et M. OLOMUCKI, *Ethyl bromoacetimidate, a NH₂-specific heterobifunctional reagent. Model reactions with ribonuclease* (*Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1979, sous presse).

J.-P. CLOT, M. BAUDRY et J. BOUHNIC, *Liver mitochondria in the chloramphenicol-treated rat : similarities with thyroidectomy* (*Biochimie*, 1978, 60, p. 539-541).

C. NÉGRÉ, S. NALTCHAYAN, J. BOUHNİK et R. MICHEL, *Comparative effects of dexamethasone and phenobarbital on adrenal cortex, liver cytochrome P-450 contents and serum thyroid hormones* (*J. Steroid Biochem.*, 1979, sous presse).

C. NÉGRÉ, N. TRIADOU, O. MICHEL, J. BOUHNİK et R. MICHEL, *Oxydative phosphorylation reactions and cholesterol hydroxylation mechanisms in human term placental mitochondria* (*J. Steroid Biochem.*, 1979, sous presse).

J. BOUHNİK, J.-P. CLOT, M. BAUDRY et R. MICHEL, *Early effects of thyroidectomy and triiodothyronine administration on rat liver mitochondria* (*Mol. Cell. Endocrinol.*, 1979, sous presse).