

Biochimie cellulaire

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

Comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent l'ontogenèse des organismes eucaryotiques demeure l'un des objectifs princeps des sciences de la vie. La réalisation de cet objectif devrait favoriser les progrès de la connaissance dans de nombreux domaines de la pathologie (maladies héréditaires, cancers, etc.) et apporter des éclairages nouveaux à certains aspects de la Biologie humaine tels que, aux deux extrêmes, le développement périnatal ou la sénescence.

Divers « systèmes » ont jusqu'ici servi de modèles à la Biochimie de la différenciation mais nous avons circonscrit notre cours, cette année, à l'étude de l'un d'entre eux : le système myogénique. On dénomme « myogenèse » l'ensemble des processus biochimiques ou morphologiques intervenant dans la conversion d'une cellule « précurseur » indifférenciée, le myoblaste (Mb), en un tissu musculaire adulte, et notre attention s'est focalisée ici sur la différenciation des cellules de muscle du squelette. La raison de ce choix est que la cellule musculaire pleinement différenciée « exprime » un nombre élevé de propriétés bien caractéristiques (protéines de la contraction, enzymes assurant un métabolisme spécifique, récepteurs, etc.) qui peuvent constituer autant de jalons biochimiques, ou marqueurs, pour analyser et suivre commodément l'ontogenèse de cette cellule. Par ailleurs, l'aptitude que possède une cellule musculaire différenciée — laquelle se présente sous la forme d'un syncythium multinucléé rempli d'organelles contractiles, les sarcomères, syncythium appelé myotube (Mt) — à contracter des liens privilégiés avec les motoneurones, *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*, ne constitue pas la propriété la moins remarquable de ce modèle d'étude.

La première partie de ce cours a été consacrée à des généralités sur l'ontogenèse de la cellule de muscle du squelette, en insistant sur les aspects proprement cellulaires.

Il est admis que les muscles, comme les cartilages, le tissu épithélial, etc. dérivent d'une aire embryologique commune appelée aire du mésenchyme.

Les premières cellules, dont on peut tracer la filiation à partir des somites et qui peuvent être considérées comme myogéniques, ressemblent sous bien des aspects aux fibroblastes, à cette différence qu'elles sont potentiellement capables de se différencier en myoblastes, puis en myotubes. Ces cellules capables de se diviser sont dénommées « myoblastes potentiels » ou « pré-somptifs » (PMB). Sous certaines conditions elles entrent en phase G_1-G_0 , puis commencent à exprimer l'ensemble des caractères liés au programme myogénique (messagers, protéines, récepteurs). Après quoi, phénomène unique parmi les lignées cellulaires chez les eucaryotes, elles se *fusionnent* ; il en résulte un syncithium plurinucléé, le *myotube*, au sein duquel les protéines « contractiles » s'organisent en des unités sarcomériques bien alignées. La membrane des myotubes présente des propriétés particulières : richesse en récepteurs cholinergiques, composition en glycoprotéines et phospholipides, existence de canaux ioniques, etc. qui font de ces myotubes des éléments « excitables » capables de répondre aux stimuli neurogènes.

Les questions clés qui ont été soulevées concernent : a) le rôle des substances douées d'« activités mytogéniques » dans le réglage de l'option entre « division et détermination » ; b) le degré d'hétérogénéité des populations myoblastiques ; c) les relations entre « cycle de division », « induction du programme biochimique » et « détermination ».

S'agissant de l'effet des substances mitogènes (somatomédines, facteurs de croissance des plaquettes, « PDGF », des fibroblastes, « FGF », ou de l'épithélium, « EGF », etc.) généralement présentes en abondance dans les milieux utilisés pour la croissance des cellules myoblastiques « primaires » ou des cellules de lignées établies, par exemple dans les sérums, nous avons décrit les expériences de Linkhart et Hauschka, utilisant la lignée de souris MM-14, dépendante du FGF. Ces expériences établissent que l'absence de substances mitogéniques (FGF) en phase G_1 déclenche une succession d'événements entraînant *in fine* la formation de myotubes différenciés : les cellules cessent de se diviser (phase G_1) puis se « déterminent » (quittent irréversiblement le cycle mitotique), expriment les divers marqueurs biochimiques (ex. : récepteurs cholinergiques, CPK, protéines de muscles, etc.), enfin se fusionnent. Le seuil des « mitogènes » dans le milieu paraît donc commander le déclenchement ou non d'une cascade d'événements culminant en une différenciation myogénique terminale.

La séquence des événements décrits pourrait inciter à croire que les myoblastes doivent *obligatoirement* se « déterminer » c'est-à-dire quitter irréversiblement leur cycle mitotique, *avant* d'exprimer leur phénotype biochimique. Il n'en est rien. Des expériences élégantes dues à Nadal Ginard et collaborateurs, et mettant en œuvre des variants myoblastiques incapables de se déterminer et de fusionner à 40 °C, même en conditions permissives, indiquent que la réduction de la concentration en « mitogènes » déclenche deux phéno-

mènes *indépendants* : la sortie définitive du cycle des divisions, et l'induction du phénotype biochimique. L'induction biochimique peut se produire sans que les cellules se déterminent (par ex. à 40 °C en milieu permissif). Elle présente alors un caractère réversible. En revanche, les deux phénomènes (détermination et induction) doivent obligatoirement se produire pour que la fusion ait lieu.

Nous avons enfin apporté des arguments en faveur du fait que tous les myoblastes issus d'un tissu en développement n'ont pas nécessairement la même destinée. Il existe chez les oiseaux, comme chez les mammifères, des myoblastes dits « précoces » qui, mis en culture, fournissent des myotubes courts, peu nucléés et dépourvus de récepteurs, des myoblastes « intermédiaires » et des myoblastes « tardifs » ayant, *in vitro*, une différenciation normale (Toutant, Fizsmann, Bonner, etc.).

La seconde partie du cours a porté sur les principales caractéristiques connues des protéines contractiles (éléments du sarcomère) y compris les plus récemment identifiées (titine, nébuline, etc.) aux plans biochimiques et physico-chimiques, ainsi que sur les mécanismes de la fusion myogénique.

Nous avons passé en revue les principales données relatives aux changements biochimiques intéressant la membrane des myoblastes et précédant la fusion. Un accent particulier a été mis sur les modifications des glycoprotéines et des phospholipides, ainsi que sur l'activation de certaines métalloenzymes douées d'activité protéolytique. L'usage des anticorps monoclonaux dans la détection des changements antigéniques a renouvelé profondément cette problématique.

Les troisième et quatrième parties ont été consacrées aux gènes des protéines contractiles envisagés sous l'angle phylogénétique autant qu'ontogénique. Après avoir développé le concept et rappelé les données se rapportant aux familles multigéniques que constituent les gènes de protéines contractiles codant pour des « isoformes » apparentées, et au polymorphisme de ces dernières, nous avons analysé en détail l'organisation, la structure et les propriétés comparées des gènes appartenant aux familles « actine » et « myosine » (« chaînes lourdes et légères »). Nous nous sommes intéressés aux hypothèses rendant compte de l'évolution des séquences « isogéniques » et avons montré à travers plusieurs exemples que l'organisation de ces séquences (notamment leur nombre, leur degré de liaison, la position des introns, etc.) varie beaucoup d'une espèce à l'autre. Parfois la structure primaire complète de certaines protéines a pu être déduite des données provenant de la séquence des gènes clonés (cas des chaînes lourdes de myosine), ce qui permet l'établissement de modèles tri-dimensionnels intéressants.

La cinquième et dernière partie traitait plus spécifiquement de nos connais-

sances actuelles des mécanismes de régulation intéressant les gènes des protéines contractiles. Plusieurs aspects ont été évoqués :

— L'activation « coordonnée » d'éléments génétiques appartenant à plusieurs familles génétiques, phénomène consistant en une synthèse coordonnée d'un ensemble de protéines sarcomériques, d'enzymes spécifiques ou de protéines membranaires, à une étape du développement coïncidant avec la fusion. Cette « activation » coordonnée, qui peut être analysée tant au niveau des RNA messagers (grâce aux sondes cDNA clonées) qu'à celui des protéines, suggère l'existence d'un mécanisme de « commutation génératrice » (ou « master switch ») opérant sur plusieurs gènes à la fois.

De nombreux arguments indiquent que cette activation intéresse l'étape de transcription des gènes considérés.

— Les activations « séquentielles » de gènes apparentés provenant d'une même famille, et qui se produisent pendant la maturation des myotubes et jusqu'au stade où apparaissent les muscles adultes. On en connaît de deux types : a) l'activation séquentielle des gènes codant pour les isoformes d'actine, au cours de laquelle un « isogène » d'un tissu différent (ex. le tissu cardiaque) s'exprime au stade embryonnaire, dans le muscle de squelette (et réciproquement). Ce mécanisme d'activation « paradoxale » est peut-être lié à la conservation, au voisinage des séquences de codage, d'éléments régulateurs provenant, par duplication, d'un élément régulateur ancestral. b) L'activation séquentielle des gènes codant pour les isoformes des myosines « lourdes » ou légères : ici on a décrit une activation en chaîne de séquences codant successivement pour des formes embryonnaires, néonatales et adultes, situation qui n'est pas sans rappeler le comportement des gènes codant pour les chaînes des sous-unités α ou β des globines chez les mammifères.

— Enfin, après avoir discuté des données sur la localisation des différents gènes clonés d'actine et de myosine sur les chromosomes, nous avons évoqué les données récentes issues des expériences menées, d'une part, par les équipes de W. Wright et H. Blau sur les hétérokaryons myoblastes x myocytes ou amniocytes x myotubes et, d'autre part, par les groupes de L. Kedes et D. Yaffi sur les transferts de séquences génomiques dans les cellules myoblastiques. Ces données plaident en faveur de l'existence de facteurs cytoplasmiques diffusibles capables d'activer en « trans » les gènes responsables du programme myogénique. Elles ouvrent également des perspectives sur la caractérisation des séquences régulatrices, sans doute proches des promoteurs et pouvant jouer un rôle dans le phénomène de commutation généralisée.

F. G.

Les thèmes des séminaires se rapportaient aux données actuelles sur les mécanismes moléculaires de la différenciation somatique des systèmes eucaryotiques supérieurs. Les titres étaient les suivants :

M^{me} D. PAULIN (Paris), *Différenciation et expression des protéines de la famille des filaments intermédiaires.*

M. M. CRÉPIN (Paris), *Régulation transcriptionnelle des gènes MMTV et β -globine. Interactions de protéines non histones avec des séquences « promoteurs ».*

M. J. MALLET (Orsay), *Données récentes sur la différenciation du système nerveux : une nouvelle voie d'approche : le génie génétique.*

M. C. BABINET (Paris), *Stade précoce du développement embryonnaire de la souris.*

M. M. FISZMAN (Paris), *Transformation oncogène et différenciation.*

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

BIOCHIMIE CELLULAIRE

L'induction neuronale dans le neuroblastome et d'autres systèmes (B. CROIZAT, F. BERTHELOT, J.-L. VAYSSIÈRE, J.C. LARCHER et M. BASSEVILLE)

Nous avons étudié essentiellement les mécanismes d'action de l'acide 1 méthyl cyclohexane carboxylique (CCA), puissant inducteur de la différenciation neuronale sur le neuroblastome.

Dans un premier temps, puisque le CCA protège le cerveau du rat en hypoxie, il semblait logique de vérifier s'il n'influence pas la consommation d'oxygène dans le neuroblastome ou, plus globalement, l'énergétique cellulaire dont le niveau peut être estimé par l'utilisation du 2-déoxyglucose selon Sokoloff.

Nos résultats montraient que le CCA induit une augmentation importante (x2) de la pénétration et de l'utilisation (formation du complexe 2-DG-isomérase) du 2-déoxyglucose par la cellule de neuroblastome.

Nous avons pensé que cette stimulation traduisait une augmentation globale

du niveau énergétique. L'effet primaire du CCA eût été une stimulation du métabolisme cellulaire. La poursuite de nos travaux nous a conduits à rejeter cette hypothèse.

Nous avons procédé à un repérage des protéines mitochondriales, puis examiné leurs changements sous l'effet du CCA et d'autres molécules à spectre pharmacologique, neuro-inductrices ou non. Nous avons comparé l'effet de ces molécules à ceux d'agents antimitochondriaux classiques (oligomycine, DNP, nonactine, azide de sodium).

Nous avons enfin effectué des mesures oxygraphiques sur des mitochondries de cerveau de souris et des cellules de neuroblastome en présence de ces diverses drogues et molécules.

Cette étude nous permet de conclure que le CCA altère le gradient électrochimique créé par le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire. Ceci provoquerait des réarrangements dans l'environnement ionique de la mitochondrie avec pour conséquence des modulations de structure des protéines filamenteuses conduisant à l'état différencié.

En fait, par son inhibition partielle de la respiration et ses effets sur certaines protéines de la mitochondrie et du cytosquelette, le CCA présente des analogies avec l'oligomycine. Il faut cependant fixer des limites étroites à cette analogie. Le CCA n'est pas un simple inhibiteur des phosphorylations oxydatives mais un puissant agent de différenciation neuronale. Son action n'est pas uniquement centrée sur la mitochondrie puisqu'il stimule l'ATPase Na^+ , K^+ membranaire. Ce dernier effet, de type membranaire, a également pour conséquence une modification des concentrations ioniques.

Il est clair que l'étude des mécanismes d'action d'un médicament potentiel, tel que le CCA, permet d'analyser certains des mécanismes moléculaires en jeu dans la différenciation terminale de la cellule nerveuse et de mettre en lumière notamment le rôle de la mitochondrie. (Nous pourrions également proposer un schéma pour un médicament vrai, le depamide ou le valproate). Quant au plan pharmacologique, on peut suggérer que la survie prolongée par le CCA du rat en hypoxie s'explique par l'effet inhibiteur partiel de la drogue sur la respiration. Ceci permettrait une adaptation à d'autres voies métaboliques.

Dans un autre domaine, des chercheurs du Maryland Cancer Center, à la suite de nos travaux, ont publié leurs résultats concernant les effets du CCA sur des cultures de cellules leucémiques.

Il est évident que le neuroblastome ne constitue qu'un modèle — commode mais imparfait — pour l'étude de la neurogenèse *in vitro*. Nous passons à des systèmes plus normaux.

Nous mettons au point les cultures primaires de neurones à partir du striatum du cerveau d'embryon de souris et du ganglion cervical de rat nouveau-né. Nous analysons également les protéines du cerveau de souris traitées par les drogues.

Expression génétique des isotubulines au cours de la neurogenèse in vivo et in vitro chez la souris (Ph. DENOULET, B. EDDÉ, V. MOURA NETO, B. DE NÉCHAUD, A. WOLFF et D. CHILLET)

Au cours de la neurogenèse, un des événements marqueurs concernant le cytosquelette neuronal est l'augmentation d'hétérogénéité des isotubulines α et β à partir desquelles les microtubules axonaux et dendritiques sont assemblés. Les isotubulines (α -acides, β' - et β -acides) qui apparaissent et s'accumulent dans les neurones sont spécifiques de ce type de cellule, constituant ainsi d'excellents marqueurs de différenciation nerveuse.

L'étude de deux systèmes de différenciation neuronale *in vitro*, le neuroblastome murin et certaines lignées de carcinome embryonnaire, nous a permis d'analyser plus précisément l'expression des isoformes β' - et α -acides. Ces isotubulines semblent étroitement associées à la différenciation morphologique (extension neuritique).

Dans le but d'élucider le rôle spécifique de chacune de ces isotubulines dans la structure et la dynamique neuronales, nous préparons actuellement des anticorps monoclonaux dirigés contre chacune de ces isoformes.

L'analyse des RNAs messagers de cerveau au cours du développement par traduction *in vitro* dans le lysat de réticulocytes nous a permis de montrer clairement qu'il existe plusieurs RNAs messagers tubuline différents, dont certains sont spécifiquement exprimés dans le tissu nerveux. A cet égard, parmi les cDNAs β -tubuline de cerveau que nous avons clonés, l'un d'eux ($pT\beta_2$) détecte spécifiquement un mRNA cérébral de 3 700 nucléotides qui apparaît et s'accumule au cours du développement. Ce RNA-tubuline n'est pas détecté parmi les RNAs messagers des autres organes. Ainsi, ce clone $pT\beta_2$ nous donne-t-il accès à un gène β -tubuline « neurospécifique » dont l'expression est modulée au cours de l'ontogenèse.

Analyse des composants du cytosquelette dans des homogénats de cerveaux de malades atteints de démence sénile d'Alzheimer (B. DE NÉCHAUD, M.M. PORTIER, en collaboration avec J.J. HAUW et C. DUYSKAERTS, Neuropathologie Charles Foix, Hôpital de la Salpêtrière)

Deux lésions histologiques caractérisent la maladie d'Alzheimer : l'amylose (encore que la nature exacte des dépôts amyloïdes soit inconnue) et la

dégénérescence neurofibrillaire qui aboutit à la formation de filaments appariés, torsadés, insolubles, aux dépens du réseau des filaments intermédiaires du cytosquelette neuronal. Ces deux lésions concourent à l'élaboration de plaques séniles dont la fréquence dans le cortex cérébral et certains noyaux de la base est corrélée avec la gravité de l'atteinte pathologique.

Nous avons analysé des homogénats de cerveaux humains par électrophorèse bidimensionnelle et identifié les différents composants du cytosquelette par leurs coordonnées électrophorétiques et leurs cartes peptidiques. Quatre régions (corne d'Amon, *Girus cingularis*, cervelet et tronc cérébral haut) de cinq cerveaux (l'un provenant d'une personne âgée saine ; trois de personnes atteintes de démence sénile modérée ; un autre d'un patient atteint d'une démence grave) ont jusqu'à présent été analysées biochimiquement. Les profils électrophorétiques diffèrent selon les régions analysées et ne sont donc comparables qu'à ceux de régions homologues. Les résultats montrent que l'atteinte du cytosquelette se situe bien au niveau du réseau des filaments intermédiaires. La gliose, souvent associée au vieillissement du système nerveux, se produit par une augmentation du pourcentage de la protéine gliofibrillaire (composant des filaments intermédiaires des astrocytes). L'atteinte du réseau neurofibrillaire n'est patente que dans le seul cas de démence grave et se signale par une diminution de la concentration des trois composants NF 200, NF 140 et NF 70 dans les homogénats de corne d'Amon et de cortex cérébral.

La périphérine, protéine spécifique du système nerveux périphérique (M.M. PORTIER, B. DE NÉCHAUD, en collaboration avec A. POUPLARD, C.H.U. Angers, et P. BRACHET, Institut Pasteur)

Les études menées précédemment permettaient de penser que la protéine observée dans la partie insoluble d'un extrait cellulaire de neuroblastome murin d'abord, puis de neurones sympathiques de rat, puis de fibres sensorielles de nerf sciatique, était spécifique du système nerveux périphérique.

Au cours de cette année, nous avons confirmé cette hypothèse et, par suite, nous appelons désormais périphérine cette protéine.

Les analyses effectuées sur les différents tissus des rongeurs ont été étendues aux tissus humains où la même localisation de la périphérine a été retrouvée. De plus, l'emploi des techniques d'immunofluorescence indirecte a permis de localiser cette protéine au point de vue cellulaire. Nous l'avons observée dans les neurones (corps cellulaires et axones) du système nerveux sympathique, ainsi que dans les neurones les plus petits des ganglions rachidiens ; ces derniers sont sensibles à l'action du NGF (« nerve growth factor ») tandis que les gros neurones des ganglions rachidiens ne le sont pas. Ceci

est en accord avec un autre résultat que nous avons obtenu et selon lequel la quantité de périphérine augmente quatre fois lorsque des cellules de PC 12 (lignées isolées à partir de phéochromocytome de rat et qui présentent des caractères de neurones sympathiques) se différencient en présence de NGF.

Notons que la périphérine n'a pas été trouvée dans les différentes parties du système nerveux périphérique de caille ; cette protéine pourrait donc être spécifique des mammifères.

La nature de cette protéine et son expression au cours du développement embryonnaire sont en cours d'étude.

Expression anormale de la vimentine dans des lignées de cellules lymphoïdes humaines ainsi que dans diverses leucémies (M.M. PORTIER, en collaboration avec K. DELLAGI et J.C. BROUET, I.N.S.E.R.M. U-108, Hôpital Saint-Louis)

La vimentine est le filament intermédiaire exprimé dans les tissus mésenchymateux et, par suite, dans les leucocytes.

Nous avons étudié son expression par immunofluorescence directe et par électrophorèse à double dimension. Parmi les 24 clones du lymphome de Burkitt étudiés, 16 n'expriment pas la vimentine tandis que 8 n'en expriment qu'une quantité réduite. Par contre, 5 clones de cellules lymphoïdes malignes non-Burkitt ainsi que 45 clones de cellules lymphoblastoïdes dérivés de cellules B normales présentent un réseau de vimentine bien développé. Or, on observe aussi une faible expression de la vimentine dans 3 clones de cellules lymphoblastoïdes provenant de malades atteints du syndrome de Langer-Giedron, qui se caractérise par une délétion à l'extrémité distale du chromosome 8. La translocation caractéristique du lymphome de Burkitt se produit aussi dans cette zone du chromosome 8. Les résultats obtenus suggèrent donc que l'altération de l'extrémité distale de ce chromosome affecterait l'expression de la vimentine. D'autre part, nous avons étudié l'expression de la vimentine dans divers cas de leucémies : myéloblastiques et monoblastiques. La vimentine est toujours présente mais en quantité variable selon les cas ; de plus, le réseau qu'elle forme diffère également d'un type de leucémie à l'autre ; ces deux critères : quantité de vimentine et allure du réseau qu'elle forme, ainsi que des variations affectant d'autres protéines du cytosquelette (tubuline et actine), apporteront des critères biochimiques qui permettront peut-être de mieux comprendre les phénomènes observés dans ces cas pathologiques.

Contrôle de l'expression ontogénique des énoïases du cerveau de souris (L. LEGAULT-DÉMARE et collaborateurs : N. LAMANDÉ, M. LAZAR, M. LUCAS et J. THIBAUT)

Pour élucider les bases moléculaires du développement du tissu nerveux l'approche de notre laboratoire a été fondée sur l'analyse du contrôle de

l'expression de protéines impliquées dans la mise en place et le maintien du phénotype différencié neuronal.

Notre groupe a choisi d'étudier une protéine marqueur des neurones, l'énolase $\gamma\gamma$, se substituant, dans les neuroblastes en voie de maturation, à l'énolase $\alpha\alpha$ qui demeure cependant exprimée seule dans l'ensemble des types cellulaires non neuronaux.

L'analyse biochimique de l'expression de ces isozymes et des mécanismes sous-jacents durant la différenciation neuronale nous a conduits à entreprendre la préparation des sondes ADN complémentaires correspondant aux protéines α et γ .

Une étude préalable a révélé que les quantités relatives les plus élevées des ARN α et γ sont celles du cerveau adulte qui, néanmoins, représentent seulement 0,2 et 0,07 % de la population globale des ARN polyadénylés traductibles dans un système acellulaire. De plus, les proportions respectives des séquences α et γ présentes dans les polysomes libres et liés de cerveau ne s'étant pas révélées privilégiées par rapport aux précédentes, l'ensemble des ARN polyadénylés de cerveau a donc été choisi comme matériel de départ pour le clonage des séquences α et γ .

Les conditions optimales propres à chacune des étapes conduisant à l'obtention des recombinants ont été établies pour un tel matériel. Une purification de la population globale d'ARN polyadénylés de cerveau a permis d'obtenir deux fractions enrichies en séquences α (1 %) et γ (0,2 %), qui ont alors été utilisées pour préparer les banques de recombinants présomptifs correspondantes. L'identification des clones recherchés est en cours.

Le système isozymique émolase représentera un bon modèle pour analyser, grâce aux sondes acquises, les mécanismes qui contrôlent l'expression différentielle d'isogènes au cours de la maturation neuronale et étudier la nature des régulations qui ajustent l'expression de gènes neuronaux en fonction de l'activité cellulaire.

Synthèse acellulaire de la dopamine- β -hydroxylase (DBH) humaine. Mise en évidence d'une relation entre l'expression génétique de la DBH et du pré-curseur des enképhalines dans les phéochromocytomes humains (C. BENLOT, J. ANTRÉASSIAN, J. THIBAUT)

L'ARN messager polyadénylé a été extrait d'une tumeur humaine, et traduit dans un système acellulaire de lysat de réticulocytes. Par immunoprécipitation à l'aide d'un sérum anti-DBH humaine, qui nous a été fourni par J.P. Henry (I.B.P.C., Paris), nous avons pu identifier un polypeptide de masse moléculaire 73.000. La protéine mature extraite du phéochromocytome a une masse

moléculaire de 80.000. L'ARN messager sédimente sur gradient avec une valeur de 22 à 23 S.

Nous avons étudié trois phéochromocytomes humains. Les ARN messagers ont été traduits *in vitro* et les produits de synthèse ont été immunoprécipités de manière à analyser les quantités de DBH, de tyrosine hydroxylase (TH) et du précurseur des enképhalines, grâce à des sérums spécifiques.

Il a été possible de mettre en évidence une relation entre l'expression génétique de la DBH et du précurseur des enképhalines, alors que l'ARN messager de la TH varie.

Purification et étude structurale de la dopamine- β -hydroxylase et de la tyrosine hydroxylase (D. PIGEON, C. BOUIGE, J. THIBAUT)

Les phéochromocytomes de rat sont des tumeurs transplantables qui permettent de produire un matériel riche à la fois en tyrosine hydroxylase et en dopamine- β -hydroxylase. Au cours des années précédentes, nous avons mis au point la méthode de purification de la TH et nous avons ainsi pu produire un anticorps spécifique qui nous a permis d'établir de nombreuses collaborations en France et à l'étranger. La purification de la DBH a également été conduite jusqu'à l'homogénéité de la protéine mais avec un rendement très faible, et nous nous efforçons d'obtenir un antisérum pour immunisation de cobayes.

La tyrosine hydroxylase a été soumise à l'hydrolyse par le bromure de cyanogène. Cet agent provoque la formation d'au moins 13 peptides, ce qui est contradiction avec les données de la littérature qui prévoient la formation de 5 ou 6 peptides.

Une étude de la phosphorylation de la TH, suivie de sa coupure par le bromure de cyanogène devrait nous permettre de savoir si l'enzyme est hétérogène ou si l'enzyme extraite de phéochromocytome de rat possède plus de 12 résidus méthionine dans sa séquence.

Au cours des étapes de purification de la DBH, il est possible d'éliminer un inhibiteur de cette enzyme. La nature de cet inhibiteur thermosensible est en cours d'élucidation.

Les canaux Na⁺ voltage-dépendants des cellules gliales : étude fonctionnelle (Y. BERWALD-NETTER, E. HOUZET, A. KOULAKOFF, D. BEAUDOIN)

Les travaux résumés ci-dessous représentent la poursuite de nos études sur le développement des structures membranaires des cellules du système nerveux central et, en particulier, sur le développement des canaux Na⁺ voltage-dé-

pendants. Précédemment, nous avons fait part de nos observations, faites à l'aide des neurotoxines spécifiques, sur l'expression des canaux Na^+ dans le tissu cérébral au cours de l'ontogenèse *in vivo* ou de la maturation des neurones fœtaux *in vitro*. La chronologie d'apparition, l'évolution quantitative, les propriétés structurelles et fonctionnelles des canaux Na^+ ont été décrites.

Par ailleurs, des essais de liaison des neurotoxines du canal Na^+ sur les astrocytes en culture ont permis de constater la présence sur ces cellules de structures analogues aux récepteurs membranaires associés aux canaux Na^+ des neurones. Au cours de l'année passée, nous avons entrepris l'analyse de leurs propriétés fonctionnelles. Ces études impliquent des mesures du flux de $^{22}\text{Na}^+$ et de sa modification sous l'effet des toxines connues pour leur action modulatrice de l'activité du canal Na^+ des cellules excitables.

L'ensemble de nos résultats montre clairement la très grande similitude entre les canaux Na^+ des astrocytes et leurs homologues neuronaux :

- 1) Les canaux sont chimiquement activables par les agonistes alcaloïdes — vétratridine ou batrachotoxine.
- 2) Les toxines polypeptidiques, telles l' α -toxine de scorpion et la toxine II d'anémone de mer, agissent de manière synergique avec les agonistes alcaloïdes et augmentent l'affinité apparente des agonistes.
- 3) L'effet de l' α -toxine de scorpion sur l'« uptake » des ions $^{22}\text{Na}^+$ est voltage-dépendant, en accord avec la dépendance de l'affinité de liaison de cette toxine du potentiel membranaire.
- 4) L'activation du canal est bloquée par la tétródotoxine ou la saxitoxine.

Cependant, les canaux Na^+ des astrocytes ne sont pas identiques aux canaux Na^+ des neurones. La divergence se situe au niveau de paramètres associés avec l'activation du canal. En effet, l'affinité apparente d'activation du canal par les toxines alcaloïdes (en absence ou en présence de la toxine de scorpion) est plus faible de un à deux ordres de grandeur que dans le cas des neurones.

La présence sur les astrocytes de canaux Na^+ voltage-dépendants, chimiquement activables, a été récemment confirmée par des enregistrements électrophysiologiques soit intracellulaires (collaboration avec les D^rs C. Bowman et H. Kimelberg, Albany, N.Y.) soit par « patch-clamp » (collaboration avec les D^rs L. Nowak et P. Ascher, E.N.S., Paris).

Les résultats de cette étude soulèvent la question fondamentale du rôle des canaux Na^+ voltage-dépendants au sein des cellules non excitables.

CYTOSQUELETTE ET MOTILITE

Au cours de cette année l'E.R. n° 230 du C.N.R.S. (M^{me} A. OLOMUCKI) a poursuivi l'étude du mécanisme de la motilité cellulaire à l'échelle moléculaire. Dans ce cadre, elle s'est occupée tout particulièrement des facteurs protéiniques et non-protéiniques susceptibles de moduler l'état structural de l'actine *in vivo*.

I. Plaquettes sanguines

1. Cytosquelettes de plaquettes sanguines non stimulées et stimulées (D.B. PHO, C. VASSEUR et E. DESBRUYÈRES)

La réactivité très marquée des plaquettes sanguines vis-à-vis d'un grand nombre de stimuli joue un rôle important dans le processus de l'hémostase. Cette propriété fait de ces cellules un matériel très utile à l'étude de la dynamique du cytosquelette. Leur stimulation provoque d'abord une activation très rapide, avec un changement de forme, puis une agrégation. L'isolement et l'analyse comparative des cytosquelettes obtenus à partir de plaquettes non stimulées et stimulées par différents agents physiologiques constituent une approche permettant de détecter les protéines impliquées dans ces phénomènes d'activation et d'agrégation, et de comparer éventuellement l'effet de ces différents agents.

En dehors de l'augmentation de la proportion d'actine dans le cytosquelette de plaquettes stimulées, on observe celle d'un polypeptide de 30.5 kDa dès l'activation et aussi au moment de l'agrégation. D'après les propriétés électrophorétiques en l'absence et en présence d'urée ainsi que la carte peptidique unidimensionnelle, comparées à celles de la tropomyosine de porc, ce polypeptide est identifiable à la sous-unité de cette dernière. Jusqu'ici, des études d'immunofluorescence ont conduit à attribuer à la tropomyosine des cellules non musculaires un rôle exclusivement structural. L'implication de la tropomyosine dans un phénomène aussi rapide que l'activation plaquettaire suggère qu'elle pourrait jouer aussi un rôle plus dynamique dans la plasticité et la motilité cellulaire.

D'autre part, on observe aussi une augmentation de l' α -actinine, caractérisée par son anticorps spécifique, plus importante dans l'agrégation que dans l'activation, que ces phénomènes soient induits par la thrombine ou l'ADP.

Enfin, une nette augmentation d'un polypeptide de 78 kDa environ, encore non identifié, est nettement observée aussi dès l'activation des plaquettes par ces deux inducteurs.

2. α -Actinine de plaquettes sanguines humaines

(F. LANDON, Y. GACHE et A. OLOMUCKI)

Trois types de chaînes polypeptidiques de 100 kDa, *a*, *b* et *c*, ont été observés dans les préparations purifiées d' α -actine (dimère de 200 kDa). Les trois chaînes se comportent comme des sous-unités d' α -actinine : des solutions d' α -actinine contenant chacun des trois polypeptides sont capables de former un gel de F-actine de façon sensible au calcium. Cependant nous avons montré que *b* provient de la protéolyse de la sous-unité *a*, soit *in situ* au cours du vieillissement des plaquettes, soit *in vitro* par action d'une protéase neutre à calcium. Les sous-unités *a* et *c* sont donc les deux sous-unités d' α -actinine présentes dans les plaquettes n'ayant subi aucune modification telle que le vieillissement ou l'activation.

3. Gelsoline de plaquettes humaines (A. OLOMUCKI, C. HUC et F. LEFÉBURE)

La protéine de 90 kDa que nous avons isolée précédemment des extraits plaquettaires sous forme d'un complexe stable avec l'actine a été obtenue à l'état libre. Par son poids moléculaire, sa reconnaissance par l'anticorps anti-gelsoline de macrophage et ses effets *in vitro* sur la polymérisation de l'actine, cette protéine semble faire partie de la famille des gelsolines — protéines qui semblent participer à la dynamique du cytosquelette.

Le rôle précis de la gelsoline dans les activités plaquettaires n'est pas encore élucidé. Quelques indices relevés dans la littérature suggèrent que le complexe stable que cette protéine donne avec l'actine se forme au cours de la stimulation de la plaquette. Nous essayons actuellement d'éclaircir ce point.

II. Interaction actine-polyamines (C. ORIOL-AUDIT)

1. Division des œufs d'amphibiens

(en collaboration avec N. GRANT et C. AIMAR)

Nos études sur les œufs ont appuyé l'hypothèse que nous avons formulée sur le mécanisme de la division cellulaire. Cette hypothèse propose que la cytokinèse est induite par les polyamines qui sont capables de promouvoir la formation et l'alignement des filaments d'actine sous le cortex, pour constituer l'anneau contractile. Des microinjections de polyamines, spermidine ou spermine, dans les œufs non fécondés d'amphibiens, provoquent la formation précoce de sillons de clivage et raccourcissent le temps du premier cycle de division de 60 à 70 %. Des câbles d'actine se forment dans le cortex des œufs activés isolés en présence de spermine.

2. Actine - macrocycles polyammonium

(en collaboration avec le professeur J.M. LEHN)

Les macrocycles polyammonium peuvent être considérés comme des analogues macrocycliques des polyamines naturelles. Nous avons montré que ces composés induisent la polymérisation réversible de l'actine en filaments et en paracristaux. Ces polymères d'actine conservent leurs propriétés biologiques : forte activation de la Mg-ATPase de la myosine et désorganisation par l'ATP. Les vitesses de polymérisation sont plus rapides avec ces composés synthétiques qu'avec les polyamines biologiques, et cette efficacité reflète la force de complexation de ces composés et leur capacité d'agir comme récepteurs ditopiques. Ces composés pourraient être utilisés pour remplacer ou amplifier l'effet des polyamines *in vivo*.

III. Structure et évolution des iminoacides déshydrogénases

(M.O. MONNEUSE, en collaboration avec P. ROUZÉ, I.N.R.A., Versailles)

La récente disponibilité des structures primaires de l'octopine déshydrogénase (ODH) et de la nopaline déshydrogénase (NpDH) de « crown-gall » nous a permis de comparer ces iminoacides déshydrogénases à l'ODH de *Pecten* et à d'autres oxydo-réductases d'origines diverses et de structure connue.

L'analyse des aspects structuraux, fonctionnels et évolutifs de ces enzymes a été entreprise par une approche théorique. Celle-ci consiste à chercher, à l'aide d'un ordinateur, des alignements de structures primaires, des prédictions de structures secondaires et de sites antigéniques et, ensuite, à comparer les données obtenues ainsi que la composition en acides aminés de tous les enzymes entre eux.

L'ODH et la NpDH présenteraient, comme la plupart des autres déshydrogénases, un domaine de fixation du coenzyme NAD(P) de superstructure (β - α - β)₂.

Les iminoacides déshydrogénases, qu'elles proviennent d'invertébrés ou de « crown-gall », semblent présenter la même parenté avec les autres déshydrogénases, de quelque origine qu'elles soient.

CHIMIE BIOORGANIQUE

Les recherches antérieures de l'équipe de M. OLOMUCKI ont montré que le noyau adénine subit dans des conditions douces une double réaction avec

les esters α -acétyléniques, $R-C \equiv C-COOR'$: addition de l'azote hétérocyclique en position 1 sur la triple liaison et formation d'amide entre le groupement NH_2 en position 6 et la fonction ester. Cette réaction, conduisant à la formation d'un cycle supplémentaire accolé à la purine d'origine, peut *a priori* s'appliquer à toutes les bases contenant le système amidinique $-N = C-NH_2$ (groupement amine en ortho par rapport à un azote hétérocyclique), c'est-à-dire à l'adénine, la cytosine et la guanine. Effectivement, la cytidine réagit aussi avec un ester chlorotétrolique ($R = ClCH_2$ dans la formule ci-dessus) de manière analogue à celle de l'adénosine en donnant une pyrimido-pyrimidine. Par contre, la guanosine ne réagit pas avec les esters acétyléniques, du moins dans les conditions douces utilisées pour effectuer ces modifications chimiques.

Une extension de cette nouvelle réaction des nucléobases aux acides nucléiques a été entreprise par P. ROQUES en prenant comme premier modèle le poly (A). Ce dernier a été traité pendant des temps variables avec le chlorotétrolate de méthyle ; le degré de modification a été déterminé par dosage chimique (détection du nombre de groupements chlorométhyle par titration par retour au moyen d'un thiol) et spectrophotométrique dans l'ultraviolet. L'influence du taux de modification chimique sur la conformation du poly (A) a été étudiée, d'une part, en suivant le dichroïsme circulaire du poly (A) diversement modifié et, d'autre part, en mesurant les températures moyennes de transition des complexes poly (A) modifié - poly (U). La transformation chimique des résidus A entraîne une distorsion de la chaîne polynucléotidique. Au-delà d'un taux de modification de 20 %, le complexe poly (A) - poly (U) ne se forme plus.

Le poly (A) modérément modifié a été attaché par ses groupements chlorométhyle à des supports solides thiolés (cystéamine - agarose commerciale ou un support préparé par nous-mêmes par action de l'homocystéine thiolactone sur le séphacryl activé). Des colonnes chromatographiques formées de ces supports absorbent sélectivement le poly (U).

ENDOCRINOLOGIE

Le groupe de recherche dirigé par le professeur R. MICHEL a poursuivi ses travaux sur les effets subcellulaires et moléculaires des hormones thyroïdiennes. Les recherches ont consisté à établir que les fonctions métaboliques du cerveau étaient sensibles à l'état thyroïdien, contrairement à une hypothèse émise antérieurement. Dans ce but, les essais ont été réalisés au niveau subcellulaire cérébral chez le rat et le singe.

1. *Influence des hormones thyroïdiennes et dérivés sur les activités subcellulaires chez le rat*

Les travaux ont consisté à comparer les activités subcellulaires à celles du foie à divers temps après thyroïdectomie (5 j, 10 j, 60 j). Les propriétés des mitochondries du cortex cérébral ou du foie sont déterminées en mesurant les vitesses des oxydations phosphorylatives et les activités de la succinate oxydase, de la β -hydroxybutyrate Cyt c réductase, de la succinate Cyt c réductase et de l' α -glycérophosphate déshydrogénase. L'activité des noyaux est estimée par la mesure de la RNA polymérase I. Dans le cerveau l'activité de l'enzyme nucléaire est diminuée dès le 5^e jour après thyroïdectomie, tandis que celle des enzymes mitochondriaux n'est abaissée de façon significative qu'après 2 mois, c'est-à-dire lors d'une hypothyroïdie installée. Dans le foie, les activités mitochondriales et nucléaires sont diminuées simultanément et dès le 5^e jour. La contre-épreuve a consisté à administrer aux animaux opérés, quotidiennement et pendant 10 j, une dose physiologique 0,25 μ g/100 g de 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3). Le traitement hormonal maintient ou restaure les activités subcellulaires dans le cerveau et dans le foie. Il ressort des résultats que les propriétés énergétiques du cerveau sont sensibles aux hormones thyroïdiennes mais que, chez le rat, les besoins du cerveau en celles-ci sont inférieurs à ceux des autres organes. Cependant, le ralentissement de la synthèse des RNA ribosomiaux qui intervient rapidement après thyroïdectomie provoque sans doute une diminution de l'ensemble des protéines cérébrales.

Nous avons étendu nos recherches à l'étude des effets sur le cerveau de la L-thyroxine et de plusieurs dérivés, chimiquement apparentés à T_3 . La comparaison entre les effets généraux et subcellulaires de plusieurs composés et de T_3 a montré que l'hormone triiodée manifeste toujours une activité supérieure à celle de T_4 . Les réponses des analogues entre eux varient selon l'organe considéré, cerveau ou foie, et avec la nature des particules, noyaux ou mitochondries. L'intensité des effets dépend de la structure : ainsi la substitution de l'iode en 3' de T_3 par un isopropyl l'augmente, la substitution de la chaîne alanine par un reste acétique la diminue, et le remplacement du pont oxygène entre les deux cycles par un carbonyle ne l'abaisse que faiblement.

2. *Influence de l'état thyroïdien sur les activités subcellulaires de diverses régions cérébrales chez le singe*

Les effets subcellulaires des hormones thyroïdiennes qui ont fait l'objet de nombreux travaux, principalement au niveau du foie chez le rat, ne paraissent pas avoir été étudiés jusqu'ici chez les primates.

Nous avons étendu nos recherches à des singes mâles, adultes, *Macaca fascicularis* (4-7 kg), chez lesquels nous avons déterminé les teneurs en iodothyronines dans la thyroïde, le sang circulant et le taux de sécrétion. Les mitochondries hépatiques et de diverses régions cérébrales (cortex, cervelet, striatum, hippocampe) ont été isolées chez des animaux normaux, thyroïdectomisés, thyroïdectomisés traités par T_4 ou T_3 par minipompe osmotique, la durée d'expérience étant de 20 j. Les vitesses de consommation d'oxygène des mitochondries hépatiques ou cérébrales placées en état 4 ou en état 3 sont inférieures chez les animaux thyroïdectomisés par rapport aux normaux. Il en est de même pour l'activité des divers enzymes mitochondriaux. Le ralentissement des réactions de phosphorylation oxydative, après thyroïdectomie, est dû à la fois à une diminution d'activité de la chaîne respiratoire (succinate c réductase moins active) et de la capacité de phosphorylation (action de l'ATPase diminuée). Dans les expériences où T_4 et T_3 sont administrées pendant 20 j on constate que, dans la plupart des cas, les activités mitochondriales sont maintenues à un niveau proche de la normale. L'activité de l'ARN polymérase I nucléolaire, et celle de l'ARN polymérase nucléoplasmique du foie et de trois régions cérébrales (cortex, cervelet, thalamus) sont abaissées par la thyroïdectomie d'environ 40 %. Le traitement substitutif par T_4 ou T_3 montre que les activités des enzymes nucléaires demeurent proches des témoins normaux.

Il ressort du travail que le cerveau de singe adulte est sensible de façon précoce à l'absence de sécrétion thyroïdienne. Le ralentissement du métabolisme énergétique est lié à la baisse de l'activité respiratoire ainsi qu'à la capacité de phosphorylation. La réduction importante des activités ARN polymérasiques et la normalisation par le traitement substitutif montrent que les effets cérébraux de la thyroïdectomie sont réversibles et que les hormones thyroïdiennes assurent la réparation permanente du matériel protéique du cerveau.

PUBLICATIONS

J.L. VAYSSIÈRE, F. BERTHELOT, B. CROIZAT et F. GROS, *Changes in mitochondrial proteins during neuroblastoma differentiation (Biochem. Biophys. Res. Commun., 120, 411-419, 1984).*

J.L. VAYSSIÈRE, F. BERTHELOT, F. GROS et B. CROIZAT, *Is the induction of neuroblastoma differentiation by CCA mediated by its effects on the electrochemical gradient ? (FEBS Lett., 1984, sous presse).*

B. DE NÉCHAUD, A. WOLFF, C. JEANTET et J.M. BOURRE, *Characterization of tubulin in mouse brain myelin (J. Neurochem., 41, 1538-1544, 1983).*

A. WOLFF, M.M. PORTIER, D. CHILLET et F. GROS, *Microhétérogénéité de la tubuline du système nerveux central de caille (Coturnix coturnix japonica) (C.R. Acad. Sci., Paris, 1984, sous presse).*

B. EDDÉ, H. JAKOB et M. DARMON, *Two specific markers for neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells (EMBO J., 2, 1473-1478, 1983).*

M.M. PORTIER, B. CROIZAT, B. DE NÉCHAUD, M. GUMPEL et F. GROS, *La protéine Y, un nouveau marqueur potentiel dans la différenciation neuronale du système nerveux périphérique (C.R. Acad. Sci. Paris, 297, série III, 57, 1983).*

K. DELLAGI, J.C. BROUET, M.M. PORTIER et G.M. LENOIR, *Abnormal expression of vimentine intermediate filaments in human lymphoid cell lines with deletion or translocation of the distal end of the 8th chromosome (Journal of the National Cancer Institute, 1984, sous presse).*

J.L. VAYSSIÈRE, F. BERTHELOT, M.M. PORTIER, P. DENOULET, B. CROIZAT et F. GROS, *Changes in the cytoskeleton and the mitochondria during neurogenesis (International Symposium on Contractile Proteins, Sassari, sous presse).*

M.M. PORTIER, B. CROIZAT, F. BERTHELOT et F. GROS, *A new inducer of neuroblastoma differentiation : its effect on cellular energetics and cytoskeletal components (Molecular Biology Approach to the Neurosciences, 1984, sous presse).*

B. CROIZAT, M.M. PORTIER, F. BERTHELOT et F. GROS, *Control of gene expression during terminal neurogenesis (Molecular Biology Approach to the Neurosciences, 1984, sous presse).*

Y. ZEITOUN, N. LAMANDÉ, A. KELLER, F. GROS et L. LEGAULT-DÉMARE, *Developmental changes in translatable mRNAs for the cerebral enolase isozymes $\alpha\alpha$ and $\gamma\gamma$ (EMBO J., 2, 1445-1449, 1983).*

M.J. KORNBLATT, A. KELLER et L. LEGAULT-DÉMARE, *Changes in the expression of $\alpha\alpha$ form of enolase during neuroblastoma differentiation (J. Neurochem., 41, 1563-1568, 1983).*

M. LAZAR, E. SALMERON, M. VIGNY et J. MASSOULIÉ, *Heavy isotope labeling study of the metabolism of monomeric and tetrameric AChE forms in the murine neuronal-like T 28 hybrid cell line (J. Biol. Chem., 259, 3703, 1984).*

J. MASSOULIÉ, S. BON, M. LAZAR, J. GRASSI, D. MARSH, K. MEFLAH, J.P. TOUTANT, F. VALLETTE et M. VIGNY, *The polymorphism of cholinesterases (in : Cholinesterases : Fundamental and Applied Aspects, M. Brzin, T. Kiauta et E.A. Barnard, eds., W. de Gruyter and Co., Berlin, sous presse).*

D. RICQUIER, J. THIBAUT, F. BOUILLAUD et Y. KUSTER, *Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue. Cell-free translation of mRNA and characterization of the mitochondrial uncoupling protein* (*J. Biol. Chem.*, 258, 6675-6677, 1983).

J. BALLESTA, G. TERENGI, J. THIBAUT et J.M. POLAK, *Immunocytochemical demonstration of dopamine-containing cells of the retina in nine animal species* (*Neuroscience*, 12, 1147-1156, 1984).

F. CESSÉLIN, L. PIQUE, X. BERTAGNA, C. BENLOT, J. ANTRÉASSIAN, M.F. PROESCHEL, F. GIRARD, F. ZOGBI, J.C. LEGRAND, J.P. LUTON, J. DAUCHY et J. THIBAUT, *Simultaneous evaluation of the catecholamine pathway and three opioid peptid-producing systems in human pheochromocytoma* (*Neuropeptides*, 4, 175-182, 1984).

O. KAH, P. CHAMBOLLE, J. THIBAUT et M. GEFFARD, *Existence of dopaminergic neurons in the preoptic region of the goldfish* (*Neurosci. Lett.*, 48, 293-298, 1984).

D. RICQUIER, G. MORY, F. BOUILLAUD, M.C. COMBES-GEORGE et J. THIBAUT, *Factors controlling brown adipose tissue development* (*Reproduction, Nutrition, Développement*, sous presse).

H. TSIANG, A. KOULAKOF, B. BIZZINI et Y. BERWALD-NETTER, *Neurotropism of rabies virus. An in vitro study* (*J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 42, 439-452, 1983).

Y. BERWALD-NETTER, D. BEAUDOIN et F. COURAUD, *Contribution to the characterization of astrocyte membrane properties* (*J. Neurochem.*, 41, suppl., S 3, 1983).

C.L. BOWMAN, H.K. KIMELBERG, M.V. FRANGAKIS, Y. BERWALD-NETTER et C. EDWARDS, *Astrocytes in primary culture have chemically activated voltage-dependent sodium channels* (*J. Neurosci*, 1984, sous presse).

M. COUÉ, J. CONSTANS, M. VIAU et A. OLOMUCKI, *The effect of serum vit D binding protein on polymerization and depolymerization of actin is similar to the effect of profilin on actin* (*Biochim. Biophys. Acta*, 759, 137-145, 1983).

N.J. GRANT et C. ORIOL-AUDIT, *Organization of microfilaments in isolated cortices of amphibian eggs* (*Biol. Cell*, 49, 5 a, 1983).

N.J. GRANT, C. AIMAR et C. ORIOL-AUDIT, *Effects of polyamines on the first division cycle of Xenopus leavis eggs* (*Exp. Cell Res.*, 150, 483-487, 1984).

Y. GACHE, F. LANDON et A. OLOMUCKI, *Polymorphism of α -actinin from human blood platelets : homodimeric and heterodimeric forms* (*Eur. J. Biochem.*, 1984, sous presse).

M. OLOMUCKI, J.Y. LE GALL, S. COLINART, F. DURANT, B. NORBERG et C. EVRARD, *Reactions of nucleobases with α -acetylenic esters, potentially useful for chemical modification of nucleic acids* (Tetrahedron Letters, 1984, sous presse).

M. OLOMUCKI et J.Y. LE GALL, *Alkoxy-carbonylation of propargyl chloride : methyl 4-chloro-2-butynoate* (Org. Synth., sous presse).

A. DEMBRI, M. BELKHIRIA, O. MICHEL et R. MICHEL, *Effets de l'administration des hormones thyroïdiennes, de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (TRIAC) ou de la 3,5-diméthyl-3'-isopropyl-L-thyronine (DIMIT) sur les activités subcellulaires chez le rat thyroïdectomisé* (Pathologie Biologie, 31, 665-667, 1983).

A. DEMBRI, M. BELKHIRIA, O. MICHEL et R. MICHEL, *Effects of short- and long- term thyroidectomy on mitochondrial and nuclear activity in adult rat brain* (Mol. Cell. Endocrinol., 33, 211-223, 1983).

S. DURBIN-NALTCHAYAN, J. BOUHNİK et R. MICHEL, *Thyroid status in the obese syndrome of rats* (Hormone Metab. Res., 15, 547-549, 1983).

R. MICHEL, A. DEMBRI et O. MICHEL, *Effets de la sénescence ou de l'état thyroïdien sur les activités subcellulaires cérébrales* (Drugs and Diseases - Maladies et Médicaments, 1, 79-89, 1984).

A. DEMBRI, J.P. CLOT, O. MICHEL, M. BAUDRY, N. MEUSY, P.C. LEGLISE et R. MICHEL, *Activités des mitochondries et des noyaux isolés de différentes régions cérébrales chez le singe (Macaca fascicularis) thyroïdectomisé* (Pathologie Biologie, 1984, sous presse).

F. BAI, R. MICHEL et P. ROSSIGNOL, *Effects of procaine on the oxidative phosphorylation of brain mitochondria from senescent rats* (Mechanism of Ageing and Development, 1984, sous presse).

A. DEMBRI, R. MICHEL, O. MICHEL, M. BELKHIRIA et E.C. JORGENSEN, *Comparative effects of thyroid hormone analogs on the activities of brain and liver mitochondria and nuclei in thyroidectomized rats* (Mol. Cell. Endocrinol., 1984, sous presse).

THÈSES

Thèse de Doctorat de 3^e Cycle

M. N. LAMANDÉ, *Modalités et mécanismes de contrôle de l'expression d'une protéine marqueur de la maturation terminale du neurone : l'énolase $\gamma\gamma$* (Option « Biologie Fondamentale », Université Paris VII, novembre 1983).

Diplôme d'Etudes Approfondies

M. D. PIGEON, *Etude de quelques propriétés physico-chimiques de la dopamine- β -hydroxylase de rat et purification à partir du phéochromocytome* (Option « Structure et Fonction des Protéines », U.E.R. de Biochimie, Université Paris VI, septembre 1983).

CONFÉRENCES, INVITATIONS, PARTICIPATION A DES CONGRÈS

Le Professeur F. GROS a été invité en juin 1983 par le Gouvernement Mexicain à donner une série de conférences sur les recherches menées au Collège de France, en présence des autorités mexicaines et de l'Ambassadeur de France. Il a prononcé une conférence sur les aspects moléculaires de la myogenèse (septembre 1983) au laboratoire du C.N.R.S. de Montpellier (service des Professeurs JEANTENS et DEMAILLE). Il a également donné une conférence générale à l'occasion de la séance de clôture du Colloque international « Biosciences 83 » à l'Institut Pasteur sur le thème « Biotechnologies ».

En février 1984, sur invitation de la Fondation Gulbenkian pour la science et la culture, il a prononcé trois conférences à Lisbonne : « Les développements récents de la Science en France », « L'avenir des Biotechnologies » et « Données récentes sur l'évolution du cytosquelette au cours de la neurogenèse ».

En mars 1984, il a conduit la délégation française (Prof. J. RUFFIÉ, M. SERRES et lui-même) au Colloque « Sciences de la vie et l'homme », organisé à Tokyo à la demande des chefs d'état et de gouvernement des pays du sommet de Williamsburg. Il a présidé la séance de clôture et prononcé une conférence sur le thème « Coopération internationale dans le domaine des Sciences de la vie ». Enfin, plus récemment, dans le cadre de la 4^e Ecole Franco-Africaine de Biologie Moléculaire (Djerba), il a donné un cours sur « Un modèle d'étude de la différenciation neurotique : la myogenèse ».

M. J.L. VAYSSIÈRE a présenté une communication au First International Symposium on Contractile Proteins, à Sassari, Italie (octobre 1983) : *Changes in the cytoskeleton and the mitochondria during neurogenesis*.

Lors de la réunion du Club Français du Cytosquelette, au laboratoire Arago de Banyuls (juin 1983), trois communications ont été présentées :

M. Ph. DENOULET : *Polymorphisme de la tubuline au cours de la neurogenèse chez la souris* ;

M. B. EDDÉ : *Marqueurs de la différenciation neuronale de cellules de carcinome embryonnaire* ;

M. V. MOURA NETO : *Hétérogénéité de la tubuline neuronale et gliale de cerveau de souris étudiée par une approche in vitro*.

M. Ph. DENOULET a donné deux conférences : 1) *Isotubulines du système nerveux et expression génétique*, à l'Hôpital Saint Vincent de Paul, Unité de Recherches sur les Virus (janvier 1984) ; 2) *Le cytosquelette : expression différentielle des tubulines et leur spécificité fonctionnelle*, dans le cadre des Conférences associées au DEA de Paris VI, « Structure et intégration fonctionnelle des protéines » (mai 1984).

M^{me} M.M. PORTIER a présenté une communication : *Une nouvelle protéine, marqueur probable de la différenciation neuronale du système nerveux périphérique*, à la réunion du Club Français du Cytosquelette sur le thème : « Polarité Cellulaire » (Banyuls, juin 1983). Elle a également présenté une discussion : *Cytosquelette fonctionnel du système nerveux tubuline et neurofilaments*, à une table ronde ayant pour thème « La Démence sénile d'Alzheimer » (Paris, juin 1983). Elle a aussi donné une conférence intitulée *Cytosquelette des cellules nerveuses* à la Faculté de Médecine d'Angers (mai 1984).

M^{me} L. LEGAULT-DÉMARE a participé au 4th International Congress of Developmental Neuroscience à Salt Lake City, U.S.A. (juillet 1983), où elle a présenté un « poster » : *Analysis of the partial switch off in cerebral $\alpha\alpha$ enolase expression during in vitro neuroblast maturation* (avec N.J. KORNBLATT et A. KELLER, Abstr. p. 43). Elle a donné une conférence à l'Institut de Biologie Moléculaire et Neurochimie (C.N.R.S.), Talence-Bordeaux (mai 1984) : *Etude de l'expression d'une protéine marqueur du neurone adulte, l'énolase $\gamma\gamma$, et de son équivalent présent dans les neuroblastes, l'énolase $\alpha\alpha$, au cours de la maturité neuronale*.

M. N. LAMANDÉ a participé au 4th International Congress of Developmental Neuroscience, à Salt Lake City, U.S.A. (juillet 1983), où il a présenté un « poster » : *Regulation of neuron specific enolase expression during neuroblast maturation in vitro and in vivo* (avec Y. ZEITOUN et L. LEGAULT-DÉMARE, Abstr. p. 44).

M^{me} M. LAZAR a participé : 1°) au 4th International Congress of Developmental Neuroscience, à Salt Lake City, U.S.A. (juillet 1983), où elle a présenté un « poster » : *Maturation and localization of acetylcholinesterase in primary cultures of foetal mouse brain* (avec M. VIGNY, E. HOUZET et Y. BERWALD-NETTER, Abstr. p. 45) ; 2°) au 2nd International Meeting on Cholinesterases, Bled, Yougoslavie (septembre 1983), où une communication a été présentée avec J. MASSOULIÉ, S. BON, J.P. TOULANT et M. VIGNY : *The*

globular forms on acetylcholinesterase : subcellular localization, solubility and hydrophobicity, metabolic relationship.

M. J. THIBAUT a présenté deux posters : 1) *A comparison of the distribution of choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in rat retina*, avec E. ECKENSTEIN, R.W. BAUGMÄN, M.V. SOFRONIEW et J. THIBAUT, au Neuroscience Meeting, Boston (novembre 1983) ; 2) *Localisation ultrastructurale de la tyrosine hydroxylase dans le néostriatum de cerveau de rat*, avec M. ARLUISON, à la réunion de la Société Française de Microscopie Electronique, Montpellier (mai 1984).

M^{me} Y. BERWALD-NETTER a prononcé des conférences sur invitation à deux congrès internationaux, en juillet 1983 : 1) *Contribution to the characterization of astrocyte membrane properties*, au 9th Meeting of the International Society for Neurochemistry, qui a eu lieu à Vancouver, Canada ; 2) *Surface membrane markers as probes for neuronal cell differentiation*, à l'International Symposium on Tissue Culture in Neurobiology, qui s'est tenu à Saskatoon, Canada. Elle a donné une conférence : *Astrocytes et Neurotransmetteurs*, en décembre 1983, dans le cadre de l'enseignement « Neurochimie Expérimentale et Clinique » (DERBH, AEA), au C.H.U. Pitié-Salpêtrière. Elle a présenté deux conférences dans des laboratoires français sur les thèmes suivants : 1) *L'emploi des neurotoxines dans l'étude du développement neuronal*, au laboratoire de Neurobiologie Cellulaire du Professeur L. Tauc, à Gif-sur-Yvette (janvier 1984) ; 2) *La toxine tétanique : marqueur des neurones naissants*, au laboratoire de Biochimie du Professeur H. Rochat, Faculté de Médecine Nord, Marseille (mars 1984).

M^{me} A. KOULAKOFF a présenté une communication orale en juin 1983, à Paris : *Etude in vitro des interactions virus neurotrope - cellules du système nerveux central*, dans le cadre d'une réunion organisée par le M.I.R. (Action concertée : « Dynamique du Neurone », thème « Neuropathologie »).

M^{lle} F. LANDON a participé à la réunion du Club Français du Cytosquelette, à Banyuls-sur-Mer (juin 1983), où elle a présenté une communication : *Isoformes d' α -actinine de plaquettes sanguines humaines* (F. LANDON, Y. GACHE et A. OLOMUCKI).

M^{me} A. OLOMUCKI a participé à la réunion du Club Français du Cytosquelette, à Banyuls-sur-Mer (juin 1983), et au First International Symposium on Contractile Proteins, à Sassari, Italie (octobre 1983), où elle a présenté deux communications : 1) *Properties of a 90 kDa protein-actin complex isolated from human blood platelets* (M. COUÉ, C. HUC, F. LEFÉBURE et A. OLOMUCKI) ; 2) *Mechanism of the interaction of serum vitamin D - binding protein with actin* (A. OLOMUCKI, M. COUÉ, M. VIAU et J. CONSTANS).

M^{lle} Y. GACHE a participé au First International Symposium on Contractile Proteins, à Sassari, Italie (octobre 1983), où elle a présenté une communi-

cation : *Isoforms of human blood platelet α -actinin* (Y. GACHE, F. LANDON et A. OLOMUCKI).

M^{me} C. ORIOL-AUDIT a donné deux conférences sur *l'actine et les polyamines dans la division cellulaire*, à l'Hôpital Broussais, I.N.S.E.R.M. U 28, Professeur Druet, et au Centre de Cytologie Expérimentale d'Ivry, Professeur Favard (octobre et novembre 1983). Elle a participé avec M^{me} N. GRANT au First International Symposium on Contractile Proteins, à Sassari, Italie (octobre 1983), où elles ont présenté une communication : *Role of polyamines in cell division of amphibian eggs* (N.J. GRANT, C. ORIOL-AUDIT et C. AIMAR).

M. M. OLOMUCKI a été invité à donner une conférence : *Méthodes et réactifs de modification chimique des macromolécules biologiques*, à l'Université de Namur, Belgique (novembre 1983). Il a présenté une communication : *Reaction of nucleic acids bases with acetylenic compounds* avec S. COLINART et J.Y. LE GALL, au 9^e Colloque de Chimie Hétérocyclique à Bruxelles (septembre 1983). Il a également participé au Colloque EUCHEM : *Organic Approaches to Biologic Problems*, à Port-Camargue (mai 1984), où il a présenté un « poster » intitulé : *A new method of chemical modification of nucleobases* avec J.Y. LE GALL et S. COLINART.

M. R. MICHEL, M. A. DEMBRI et M^{me} O. MICHEL ont participé au 13th Annual Meeting of European Thyroid Association, à Madrid (juillet 1983). Ils ont présenté deux communications : 1) *Effect of short- and long term thyroidectomy on mitochondrial and nuclear activity in adult rat brain*, Abstract n° 139 (A. DEMBRI, M. BELKHIRIA, O. MICHEL et R. MICHEL) ; 2) *Relation between the structure and subcellular activities of iodothyronine analogs in rat brain and liver* (R. MICHEL, A. DEMBRI, O. MICHEL, M. BELKHIRIA et E.C. JORGENSEN), M. R. MICHEL et M^{me} O. MICHEL ont participé au 4^e Congrès Français d'Endocrinologie, à Marseille (septembre 1983). Ils ont présenté une communication : *Effets de la thyroïdectomie sur les mécanismes d'oxydation des acides gras*, Abstract n° 4 (R. MICHEL, O. MICHEL et G.H. DELTOUR, *Ann. Endocrinol.*, 44, 148, 1983). M. R. MICHEL et M^{me} O. MICHEL ont été invités au Symposium Européen sur Les Expressions Métaboliques et Tissulaires de la Pathologie Cérébrale Ischémique, à Rome (mars 1984).

DISTINCTION

M. M. OLOMUCKI a été nommé Chevalier de l'Ordre National du Mérite.