

Biochimie cellulaire

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

L'étude de l'expression des gènes dans le tissu nerveux adulte ou en voie de développement fournit des éclairages intéressants à notre compréhension de la complexité du système nerveux central, de sorte que l'on peut parler aujourd'hui d'un domaine nouveau des neurosciences : la *neurobiologie moléculaire*.

Dans notre cours, nous nous sommes efforcé de faire le point sur certaines réalisations qui ressortissent de l'analyse quantitative des produits de transcription des gènes du tissu cérébral, des résultats de clonage de séquences d'ARN ou d'ADN complémentaires correspondant à des protéines spécifiques du tissu nerveux, de l'emploi des anticorps monoclonaux pour explorer certains antigènes neurospécifiques et de la mise en évidence des facteurs d'adhésion intercellulaires, etc. En effet, l'ensemble des données qui en émanent montrent que l'ontogenèse, les phénomènes d'interactions neuronales, l'établissement et le maintien d'ensembles neuronaux intégrés ou certaines neuropathologies relèvent de mécanismes dont on commence à entrevoir les bases moléculaires.

Les travaux de Hahn, Chikaraschi, Sutcliffe et de leurs collaborateurs permettent d'affirmer aujourd'hui que les mécanismes d'expression génétique dans le cerveau répondent à des modalités très particulières et, pour la plupart d'entre elles, inattendues.

On part du postulat que la complexité organisationnelle et physiologique du cerveau des mammifères trouve sa contrepartie dans la capacité que posséderait cet organe de synthétiser une variété considérable de protéines de spécificités différentes.

Dès lors, il n'est pas déraisonnable d'avancer l'idée selon laquelle la richesse informationnelle de la fonction cérébrale est liée à la fabrication de protéines propres à cet organe.

Les biologistes se sont donc attachés à établir le degré de complexité macromoléculaire du cerveau en mesurant, par différentes méthodes, le nombre de RNA exprimés et en précisant la nature de ces RNA messagers. On a eu recours notamment aux techniques d'hybridation moléculaire qui consistent à établir la cinétique d'appariement entre les ADN complémentaires transcrits des RNA messagers poly(A)⁺ totaux d'une part, et ces « messagers » d'autre part, en mesurant le nombre de séquences provenant d'ADN à copies uniques qui se trouvent appariées à l'ARN messenger lorsque celui-ci est présent à saturation. On s'est également intéressé à la taille moyenne des molécules, à leur richesse relative en séquences poly A terminales, etc.

La « complexité » du cerveau en RNA messagers est de 3 à 4 fois supérieure à celle de tout autre organe. Les données les plus récentes indiquent qu'elle correspond à environ 30 000 espèces distinctes pour ce qui concerne le cerveau des rongeurs, la majorité de ces espèces étant exprimé de façon quasi exclusive dans le tissu cérébral. Cette très grande complexité transcriptionnelle se retrouve au niveau de chaque neurone pris isolément ; c'est donc une propriété intrinsèque de la cellule neuronale que de pouvoir potentiellement transcrire un nombre de gènes très supérieur à celui observé dans les cellules appartenant à d'autres phénotypes. Ce point a pu être établi en comparant les complexités (techniques de saturation) des RNA messagers en provenance d'aires cérébrales spécifiques et distinctes, ou en étudiant ces complexités dans des populations homogènes de cellules neuronales émanant de lignées établies. Toutefois si les neurones synthétisent une très grande variété de RNA messagers, l'étude de la complexité des RNA présents dans les polysomes indique que seule une fraction restreinte des produits de transcription des gènes est traduite en protéines. On peut penser que la complexité élevée des messagers *polysomiques* du cerveau (et, partant, la grande variété de protéines qu'on y trouve) résulte ici d'un effet de sommation des espèces exprimées dans une population neuronale extrêmement hétérogène, chaque aire cérébrale étant probablement assortie de protéines spécifiques propres à l'aire considérée. En d'autres termes, la diversité fonctionnelle des différents territoires anatomiques du cerveau aurait pour fondement une régulation de caractère post-transcriptionnel.

Mais la particularité la plus remarquable de la biologie moléculaire des gènes du cerveau réside probablement dans le fait qu'une proportion des RNA messagers totaux plus élevée que dans tout autre tissu (environ 50 %) appartient à la catégorie des RNA dits poly(A)⁻ c'est-à-dire pratiquement dépourvus de terminaisons poly-adiénylées en terminaison 3'OH. Il est facile de montrer que ces « messagers » poly(A)⁻ englobent, pour l'essentiel, un ensemble de séquences moléculaires distinctes de celles qui composent l'ensemble des messagers poly(A)⁺. Ils sont donc transcrits de gènes distincts de ceux qui sont à l'origine des messagers poly(A)⁺. Ces messa-

gers de type poly(A)⁻ semblent présenter un intérêt considérable si l'on songe que la plupart d'entre eux sont absents du cerveau de mammifères *avant* la naissance et ne commencent à s'accumuler qu'au stade post-natal. On peut penser, compte tenu de l'influence des facteurs exogènes (environnement, apprentissage, etc.) sur le développement du cerveau dans la phase tardive que ces mêmes facteurs pourraient régler de quelque manière les gènes transcrits en RNA messagers de type poly(A)⁻.

Autre caractéristique assez remarquable des RNA messagers du cerveau : les espèces les plus rares [présentes à raison de 1 à 3 copie(s) par neurone au moins] sont en général plus longues que les espèces les plus abondantes. De plus, elles ont tendance à correspondre au phénotype neuronal, les espèces abondantes étant souvent de caractère ubiquitaire. Ceci semblerait indiquer que les gènes *spécifiquement exprimés* dans le cerveau revêtiraient une organisation moléculaire particulière. Cette hypothèse paraît avoir reçu confirmation grâce aux travaux de Sutcliffe. Cet auteur a démontré qu'il existe dans certains « introns » des gènes « neuro-spécifiques » de courtes séquences nucléotidiques d'un type particulier, appelées « identifyers » ou séquences ID. Ces séquences sont répétées plusieurs dizaines de milliers de fois dans le génome. Elles comprennent généralement 82 nucléotides dont l'agencement colinéaire a été déterminé. Ces séquences ID agiraient comme des éléments régulateurs positifs permettant à la RNA polymérase III « d'initier » la transcription des gènes neurospécifiques en rendant ces derniers « accessibles » à l'action de la RNA polymérase II.

De très nombreux laboratoires ont commencé à établir des banques de c-DNA (ADN complémentaires) à partir des messagers totaux provenant du tissu cérébral adulte. Ces c-DNA ont pu être classés en plusieurs catégories en fonction des aptitudes qu'ils présentent à former des hybrides avec des messagers provenant, soit exclusivement de neurones, soit exclusivement de cellules non-neuronales, soit avec des cellules de phénotypes mixtes. L'emploi des sondes ainsi obtenues a permis d'explorer d'une part certaines phases du développement du cerveau, d'autre part les fonctionnements sélectifs d'aires cérébrales distinctes.

Une autre exploitation des résultats issus des techniques de recombinaison génétique *in vitro* réside dans l'identification, à partir de séquences de c-DNA neurospécifiques clonées, de polypeptides nouveaux pouvant jouer un rôle particulier dans la physiologie du cerveau.

Dans les autres parties de notre cours nous avons décrit d'autres aspects de la Biologie moléculaire du gène se rapportant au fonctionnement neuronal normal et pathologique. Citons :

— L'étude des mécanismes d'épissage différentiel pouvant conduire à partir d'un seul et même gène à la production, selon le phénotype tissulaire

considéré, soit à une hormone polypeptidique, soit à un neuropeptide. Le cas le plus remarquable est celui du gène qui produit le neuropeptide CGRP dans le système nerveux, et la calcitonine dans les tissus non-neuronaux...

— L'analyse des *combinatoires* dans l'expression génétique de groupes de neurones (ex. : travaux de Richard Axel sur l'Aplysie) pouvant expliquer des *comportements différenciés*.

— Le repérage au moyen de séquences génomiques clonées, grâce à l'analyse du polymorphisme génomique par les enzymes de restriction, des sites mutationnels responsables de certaines neuropathies, telles que la chorée d'Huntington, etc.

— Le clonage de toute une série de gènes codant pour des protéines ayant une importance fonctionnelle déterminante au niveau du système nerveux (neuropeptides, récepteurs de neurotransmetteurs, canaux ioniques, enzymes neurospécifiques, etc.).

Enfin, délaissant les aspects strictement génétiques, nous avons également illustré sur quelques exemples certaines des percées réalisées dans l'étude des antigènes de surface des neurones grâce à l'emploi des anticorps monoclonaux (notamment dans le système nerveux de la sangsue), et dans l'analyse des facteurs d'adhésion neuronaux.

Des progrès spectaculaires ont en effet été enregistrés dans l'identification, la purification et l'étude des facteurs responsables de l'adhésion cellulaire. Des facteurs spécifiques du tissu hépatique ou d'autres tissus non-neuronaux (L-CAM), des neurones (N-CAM) ou des interactions neurones - cellules gliales (Ng-CAM) ont été mis en évidence. Les gènes de certains d'entre eux ont d'ailleurs été clonés et l'étude de leur régulation pourrait s'avérer importante pour expliquer les phénomènes de migration d'interaction cellulaires.

F. G.

SÉMINAIRES

M. J.P. THIERRY (Paris), *Mécanisme moléculaire impliqué dans le développement précoce du système nerveux.*

M. A. MATUS (Basel), *Cytoskeleton proteins and nerve cell development.*

M. J. MASSOULIÉ (Paris), *Le polymorphisme moléculaire des cholinestérases.*

M. D. SELLOS (Concarneau), *Spermatogenèse et organisation du matériel génétique : les chromatines d'Invertébrés marins.*

— *Spermatogenèse chez les Vertébrés.*

M. J.F. LENNON (Concarneau), *Un exemple de turbulence faible en Biologie : les rythmes biologiques des organismes de la zone des marées.*

M. A. VAN WORMHOUDT (Concarneau), *Hormones peptidiques chez les Crustacés.*

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 les mécanismes moléculaires d'action, comme agents de la différenciation du neuroblastome, de certaines drogues manifestant des propriétés pharmacologiques au niveau du SNC. Cette étude répond à un double objectif : comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent l'ontogenèse de la cellule neuronale et le mode d'action de médicaments réels ou potentiels. Nous nous sommes particulièrement intéressés au dipropylacétate de sodium (valproate) et à l'acide 1 méthyl cyclohexane carboxylique (CCA).

Nous avons montré que ces molécules différencient la cellule du neuroblastome, au moins en partie, via la mitochondrie : 1) leurs effets sur la fonction mitochondriale, les protéines du cytosquelette et certains marqueurs neuronaux ont été comparés à ceux d'agents antimitochondriaux classiques ; 2) des mesures oxygraphiques ont été effectuées sur la cellule de neuroblastome et la mitochondrie purifiée du neuroblastome et du cortex de cerveau de souris ; 3) enfin, ont été mesurées les activités de l'ATPase mitochondriale F_1-F_0 et de l'ATPase membranaire Na^+K^+ du cerveau de souris.

L'analyse des résultats permet de postuler que le valproate et le CCA :

1) bloquent le gradient électrochimique créé par le transport d'électrons le long de la chaîne respiratoire par leur action sur l'ATPase mitochondriale (ils bloquent spécifiquement le composant F_1) ;

2) produisent un effet découplant, comme un ion perméant, en raison de leur faible acidité.

Ces effets provoquent une déplétion d'ATP, causant un arrêt des divisions cellulaires, et des changements dans l'environnement ionique de la mitochondrie. Ceci crée des réarrangements dans les structures filamenteuses qui conduisent de proche en proche à l'état différencié. La stimulation de l'ATPase membranaire Na^+K^+ modifie également les concentrations ioniques. Il faut noter que la stimulation de l'ATPase Na^+K^+ est considérée comme un effet primaire du NGF.

Nous nous appliquons à tester la valeur de ce modèle sur d'autres systèmes de cellules neuronales et le cerveau de souris.

Expression des isotubulines au cours de la neurogenèse in vivo et in vitro chez la Souris

(Ph. DENOULET, B. EDDÉ, B. DE NÉCHAUD, A. WOLFF et D. CHILLET)

Au cours de la neurogenèse, un des événements majeurs 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 cellulaire. Elles constituent d'excellents marqueurs de différenciation précoce et tardive de la cellule nerveuse.

L'analyse des RNAs messagers de cerveau en développement nous a permis de montrer que l'expression de ces isotubulines neurospécifiques est sous un double contrôle, post-traductionnel pour les α acides et transcriptionnel pour les isoformes β' et β acides.

Ainsi, il est clair que la famille multigénique tubuline contient des isogènes (au moins β) dont l'expression, contrôlée au cours du développement, est liée spécifiquement aux processus de différenciation de la cellule nerveuse.

Dans le but d'élucider le rôle spécifique des diverses isotubulines dans la structure et la dynamique neuronales, nous préparons actuellement des anticorps monoclonaux dirigés contre chacune des isoformes. Des souris Balb/c ont été immunisées par injection de tubuline couplée à un haptène puis leurs splénocytes fusionnés avec un myélome de souris SP2. De nombreux hybridomes anti-tubuline ont été obtenus à partir de plusieurs fusions. Le clonage est en cours.

Etude du cytosquelette de l'épithélium thymique humain en conditions normales et pathologiques

(A. WOLFF, en collaboration avec W. SAVINO, Hôpital Necker, I.N.S.E.R.M. U-25, Paris)

L'épithélium thymique exprime les produits du complexe majeur d'histocompatibilité et sécrète les hormones thymiques qui sont responsables de la différenciation intra-thymique des cellules T.

Compte tenu de l'importance du cytosquelette dans les événements membranaires et les fonctions sécrétoires, nous avons analysé par des méthodes immunochimiques la composition en protéines de ce cytosquelette dans l'épithélium thymique humain *in situ* et *in vitro*.

La présence des éléments classiques du cytosquelette a été détectée : actine, myosine, tubulines. En ce qui concerne les protéines des filaments intermédiaires, les cytokératines 4, 5, 7, 8, 14 et 18 ont été caractérisées comme composants majeurs dans le thymus normal. Par contre, dans des situations pathologiques comme des thymomes ou des hyperplasies (*myasthenia gravis*), des changements importants dans l'expression des kératines ont été observés.

Altérations de la composition du cytosquelette dans le nerf sciatique de souris au cours de la dégénérescence wallérienne

(B. DE NÉCHAUD, en collaboration avec M. GUMPEL, Hôpital de la Salpêtrière, I.N.S.E.R.M. U-134, Paris, et J.M. BOURRE, Hôpital F. Widal, I.N.S.E.R.M. U-26, Paris)

Après section du nerf sciatique, on observe dans le segment distal une perte rapide des composants axonaux suivie par une démyélinisation. Les changements de composition du cytosquelette ont été étudiés par électrophorèse bidimensionnelle et « immunoblotting ».

En trois jours, le triplet de neurofilaments et la périphérine disparaissent tandis que de nombreux peptides détectables par l'anticorps de Pruss s'accumulent. Certains persistent après 1 mois.

En ce qui concerne la tubuline, la section du nerf provoque dans la partie distale la disparition des isoformes α acides, β' et β acides. Les isotubulines de type ubiquitaire, qui persistent un mois après la section, sont représentatives des cellules de Schwann, qui prédominent alors dans cette partie du nerf. Ces résultats confirment, d'une part, que l'expression des isotubulines par les cellules gliales de ce type est moins diversifiée que dans les neurones et que, d'autre part, les isotubulines α acides, β' et β acides qui disparaissent après section du nerf sont bien spécifiques des neurones.

Etude du transport axonal des isotubulines et des neurofilaments dans le nerf sciatique de rat

Ph. DENOULET et B. DE NÉCHAUD, en collaboration avec L. DI GIAMBERARDINO et G. FILIATREAU, Département de Biologie, C.E.N. de Saclay, Gif-sur-Yvette)

Nous avons entrepris l'étude du transport axonal des éléments du cytosquelette dans le nerf sciatique de rat.

En ce qui concerne les tubulines, nous avons montré que les différentes isoformes se répartissent de manière spécifique entre compartiment soluble et compartiment fibrillaire. En particulier, au niveau de la sous-unité α , l'isoforme α'' est essentiellement soluble dans l'axone tandis que les isoformes α' et α''' sont exclusivement retrouvées dans la fraction fibrillaire. Ceci témoigne du fait que les diverses isotubulines ne sont pas toutes intégrées de la même manière dans les structures microtubulaires de l'axone. Ces variations dans le degré et/ou le mode de polymérisation pourraient alors refléter des différences dans les rôles respectifs joués par ces diverses isoformes. Toutes ces isoformes se déplacent dans le ScA (composant lent A). Mais deux d'entre elles, β' et α acides, sont retrouvées également dans le ScB (composant lent B), ce qui signifie qu'elles sont transportées dans l'axone à une vitesse environ deux fois plus grande que celle à laquelle migre l'ensemble des tubulines. Cette observation renforce l'hypothèse que les diverses isotubulines neuro-spécifiques jouent des rôles différents dans les structures ou les mécanismes axonaux.

En ce qui concerne les neurofilaments, le triplet de protéines qui les constituent est transporté dans la fraction fibrillaire du ScA. L'étude de leur cinétique de synthèse et de transport a permis de mettre en évidence l'existence de modifications post-traductionnelles qui affectent surtout les deux plus grosses sous-unités. Ces modifications se traduisent par une altération de la charge (acidification du NF 200) ou du poids moléculaire apparent (NF 150) des sous-unités et interviennent au cours du transport.

La périphérine, nouvelle protéine de filament intermédiaire, spécifique du système nerveux périphérique (M. M. PORTIER, M. ESCURAT)

Les études menées précédemment avaient permis d'établir que la périphérine, observée pour la première fois dans un extrait cellulaire de neuroblastome murin, était une protéine spécifique du système nerveux périphérique de mammifères. Toutes les analyses réalisées depuis sur des cellules et tissus d'origines diverses ont confirmé ce résultat.

D'autre part, nous avons observé que la périphérine était insoluble dans un tampon renfermant du Triton X100 à une concentration de 1 % (v/v),

et que l'anticorps antipériphérine décorait une structure filamenteuse. Les protéines de filaments intermédiaires présentent aussi ces deux caractéristiques ; de plus, toutes celles qui ont été analysées jusqu'à présent possèdent un domaine conservé responsable de leur assemblage en filaments de 10 nm. Nous avons démontré que la périphérine était dotée des deux propriétés de ce domaine : la présence d'un seul résidu tryptophane situé dans la partie centrale de la molécule et celle d'un déterminant antigénique commun à toutes les protéines de filaments intermédiaires. Ces résultats permettent donc de penser que la périphérine est une protéine de filament intermédiaire, non observée jusqu'à présent sans doute en raison de sa spécificité restreinte. Elle est aussi un nouveau marqueur neuronal, spécifique du système nerveux périphérique ; c'est, de plus, une protéine de structure.

De tels marqueurs ont déjà été décrits pour différents types cellulaires du tissu nerveux : neurofilaments dans les neurones, protéine fibrillaire acide (GFAP) dans les astrocytes, vimentine dans les cellules de Schwann. On sait l'utilité de tels marqueurs dans une étude de la différenciation cellulaire.

L'étude conjuguée de l'expression génétique de la périphérine dans le tissu normal, au cours du développement et chez l'adulte, et dans des situations pathologiques devrait permettre d'appréhender la fonction de cette protéine.

Contrôle de l'expression génétique des émolases cérébrales au cours de la neurogenèse

(L. LEGAULT-DÉMARE et coll. : N. LAMANDÉ, M. LAZAR et M. LUCAS)

Nous poursuivons notre étude concernant l'analyse de l'expression ontogénique des émolases $\alpha\alpha$ et $\gamma\gamma$, marqueurs de la neurogenèse, essentiels dans le métabolisme énergétique des neuroblastes ($\alpha\alpha$) et des neurones adultes ($\gamma\gamma$).

Nous avons précédemment établi que, durant l'ontogenèse et dans des cultures cellulaires en voie de maturation, l'expression de ces émolases est contrôlée par un mécanisme de nature transcriptionnelle et (ou) post-transcriptionnelle mais non traductionnelle. La préparation de sondes ADN complémentaires correspondant aux ARN messagers des polypeptides α et γ a été alors entreprise. Ces ARN messagers, qui sont des espèces minoritaires, ont été partiellement purifiés. La fraction enrichie en séquences α et γ ainsi obtenue a permis de préparer une banque de recombinants.

Dans une telle banque, les séquences α et γ représentant encore moins de 1 % de l'ensemble de la population, nous avons choisi une stratégie de clonage fondée sur l'emploi de sondes synthétiques. Pour ce faire, les émolases $\alpha\alpha$ et $\gamma\gamma$ de cerveau de souris ont tout d'abord été purifiées (collaboration avec J. THIBAUT) et leurs séquences partielles respectives établies,

permettant de synthétiser dans chacun des cas deux sondes (oligodésoxy-nucléotides de 14-mère). Nous déterminons actuellement les conditions optimales de sélection des recombinants présomptifs par cette approche hautement spécifique.

Les sondes acquises permettront de progresser dans l'étude de la régulation des gènes neuronaux α et γ au cours du développement.

Etude de la structure de la tyrosine hydroxylase (TH)

(D. PIGEON et J. THIBAUT)

Cet enzyme est purifié à partir de phéochromocytome de rat. 100 g de tumeur permettent d'isoler environ 15 mg de protéine pure à 98 %. L'hétérogénéité de la molécule est visible par électrophorèse en deux dimensions. Cette technique révèle des points isoélectriques variés et des masses moléculaires différentes. Ces hétérogénéités sont dues à des phénomènes post-traductionnels (phosphorylation) et à des protéolyses lors de la purification.

Incubée en présence d'ATPase et de Mg^{++} , cette protéine se phosphoryle spontanément. L'activité protéase kinase est associée à la TH ; on peut l'éliminer par passage de l'enzyme sur une colonne d'hydroxy-apatite.

Application des propriétés antigéniques de la TH : réalisation de sérums anti-TH polyclonal et monoclonal ; utilisation de ces sérums

(M. KRIEGER-POULLET et J. THIBAUT, en collaboration avec M. ARLUISON, M. DIETL et H. ROHER)

La tyrosine hydroxylase purifiée de rat a servi à préparer des antisérums polyclonaux chez le lapin et monoclonaux chez la souris.

Ces antisérums se sont révélés être des outils très précieux pour les immunocytologistes et ont permis de localiser avec précision les neurones dopaminergiques (corps cellulaires et terminaisons nerveuses) tant dans le cerveau que dans la moelle épinière du rat. Ces antisérums sont capables de révéler la présence de la tyrosine hydroxylase dans le système nerveux périphérique et central de toutes les espèces étudiées, de l'homme jusqu'aux insectes. La cartographie fine des neurones à TH a pu être reprise dans le cerveau de parkinsonniens post-mortem.

De plus, un dosage sérologique fin de la TH par immuno-essai est en cours de réalisation ; il devrait permettre de détecter des quantités de TH de l'ordre du nanogramme.

CYTOSQUELETTE ET MOTILITÉ

L'U.A. 521 du C.N.R.S. (A. OLOMUCKI) a poursuivi cette année l'étude des facteurs protéiniques et non-protéiniques susceptibles de moduler l'état structural de l'actine dans la cellule.

I. Plaquettes sanguines

1. Cytosquelettes de plaquettes de porc non stimulées et stimulées (D.B. PHO et E. DESBRUYÈRES)

L'analyse électrophorétique des cytosquelettes isolés à partir de plaquettes non stimulées et stimulées permet de déceler et de caractériser certaines protéines impliquées dans l'activation et l'agrégation plaquettaires.

En dehors de la tropomyosine et de l' α -actinine que nous avons pu caractériser, un polypeptide de 79 kDa est aussi nettement augmenté dans le cytosquelette des plaquettes activées par la thrombine ou par l'ADP. Il l'est plus encore dans celui des plaquettes agrégées soit par la thrombine soit par l'ADP et le fibrinogène, en présence de faibles concentrations de calcium. Il disparaît cependant du cytosquelette de plaquettes agrégées par l'ADP seul en présence de fortes concentrations de Ca.

Il semble donc, d'une part, que la protéine correspondant à ce polypeptide intervienne dans la dynamique plaquettaire et, d'autre part, que sa présence dans le cytosquelette dépende de la concentration de calcium libre.

Nous essayons de déterminer ses propriétés physicochimiques et son rôle dans le cytosquelette.

2. Alpha-actinine de plaquettes humaines (F. LANDON, Y. GACHE, H. TOUITOU et A. OLOMUCKI)

Nous avons montré précédemment qu'il existe dans les plaquettes humaines trois isoformes d' α -actinine : aa, cc et ac.

Au cours de cette année, nous avons précisé les caractéristiques structurales et fonctionnelles des homodimères aa et cc. Cette étude a permis de montrer que aa et cc :

— ont les propriétés des α -actinines (capacité d'augmenter l'activité Mg-ATPase de l'actomyosine, de se fixer sur les filaments d'actine et de former des gels d'actine). Ces activités sont sensibles à la concentration en calcium du milieu, comme c'est le cas pour les α -actinines non musculaires.

L'interaction avec les filaments d'actine se fait dans un rapport d'une molécule d' α -actinine aa ou cc pour dix molécules d'actine ;

— présentent des différences structurales, mises en évidence par leurs cartes peptidiques et leur réactivité immunologique, et des différences fonctionnelles, révélées par leur efficacité de gélification et la sensibilité au calcium de leur liaison avec l'actine.

3. *Gelsoline de plaquettes humaines*

(A. OLOMUCKI, C. HUC et F. LEFÉBURE)

Nous avons précédemment isolé à l'état pur la gelsoline plaquettaire à partir de son complexe stable avec l'actine. Nous étudions actuellement son interaction avec l'actine de plaquette *in vitro*.

La protéine libre ainsi que son complexe avec l'actine accélèrent l'étape de nucléation et réduisent le taux de polymérisation de l'actine. Les effets de la gelsoline sont dus, d'une part, à sa capacité de former des nuclei en captant les monomères de l'actine et, d'autre part, à sa capacité de se fixer aux bouts des filaments à croissance rapide.

La gelsoline libre, à la différence du complexe, est susceptible de fragmenter les filaments d'actine préformés. Ce phénomène a été confirmé, entre autres, par la microscopie électronique.

La gelsoline de plaquette, tout comme les autres gelsolines cytoplasmiques, est un modulateur, dépendant du calcium, de l'état structural de l'actine dans la cellule.

II. *Actine et polyamines : induction de la division cellulaire (cytodiérèse) et interaction physico-chimique* (Ch. ORIOL-AUDIT)

Le mécanisme de la cytodiérèse que nous avons proposé suggère que les polyamines, spermidine et spermine, provoquent la division du cytoplasme en induisant l'organisation des filaments d'actine qui constituent l'anneau contractile. Cet anneau est l'organelle de clivage de la cellule. Nous étudions ce mécanisme sur les œufs d'amphibiens. Nous avons montré que des micro-injections de polyamines dans des œufs non fécondés induisent la formation précoce de sillons de clivage et l'organisation des filaments d'actine sous le cortex. Par contre, les inhibiteurs des enzymes de la biosynthèse des polyamines retardent le temps de clivage des œufs activés. Ce retard peut être supprimé par l'addition des polyamines. (En collaboration avec C. AIMAR, Paris VI, et N.J. GRANT.)

Les polyamines peuvent induire *in vitro* les diverses formes polymériques de l'actine. Nous avons déterminé les paramètres moléculaires de la fixation des polyamines aux formes filamentaire et paracristalline de l'actine. (En collaboration avec E. CARON et H. TOUITOU.)

III. *Cristallogénèse des protéines*

(A. OLOMUCKI et C. DUBORD, en collaboration avec A. DUCRUIX, I.C.S.N., Gif-sur-Yvette)

Nous avons précédemment décrit les effets, sur la polymérisation de l'actine, de la protéine sérique du transport de la Vit D₃ (DBP). Cette protéine, purifiée par J. CONSTANS et coll., du Centre d'Hématologie de Toulouse, a la capacité de donner un complexe (1 : 1) stable avec la G-actine et de dépolymériser les filaments préformés.

Nous avons entrepris des essais de cristallisation de la DBP sous sa forme d'apoprotéine, d'holoprotéine (avec la Vit D₃) et de complexe avec l'actine. Ce dernier est particulièrement intéressant car sous cette forme l'actine ne peut pas polymériser. On devrait donc pouvoir obtenir des monocristaux d'actine native liée à la DBP et les étudier aux rayons X.

Par la méthode de diffusion gazeuse nous avons déjà obtenu des cristaux d'apoprotéine. Ce sont des plaquettes à base carrée de dimension allant jusqu'à 500 × 500 × 200 μm. Les études préliminaires de diffraction des rayons X (résolution 4 Å) ont montré que la DBP cristallise dans le système monoclinique et ont permis d'établir tous les paramètres de cette maille cristalline. Ce travail est actuellement poursuivi.

CHIMIE BIOORGANIQUE

L'équipe de M. OLOMUCKI a poursuivi l'étude de la dérivatisation des bases des acides nucléiques à l'aide des esters α-acétyléniques, qui conduit à l'adjonction d'un cycle pyrimidone supplémentaire à la pyrimidine ou la purine d'origine. Cette réaction, mise au point initialement dans le cas des nucléosides et étendue par la suite au poly(A), a pu être appliquée aux nucléotides. Trois nucléotides modifiés, dérivés de l'AMP, l'ADP et l'ATP ont été ainsi obtenus puis testés pour leur activité vis-à-vis des enzymes utilisant les nucléotides comme substrats (kinases) ou des enzymes pour lesquels les nucléotides peuvent constituer des ligands analogues des coenzymes (déshydrogénases). Les principaux résultats de cette étude, effectuée par F. BLOIS en association avec F. THOMÉ, de l'UA 521 C.N.R.S., sont les suivants :

Kinases

L'adénylate kinase peut utiliser l'ATP modifié (mATP) à la place de l'ATP en le transformant en mADP ; par contre, elle ne reconnaît pas le mAMP. Ce résultat est en accord avec l'existence connue de deux sites dans l'adénylate kinase, l'un, de spécificité étroite, reconnaissant l'AMP et l'autre, peu spécifique, acceptant l'ATP. La *pyruvate kinase* reconnaît le mADP comme substrat, mais avec une K_M 25 fois plus élevée et une V_{max} 6 fois plus faible que pour l'ADP. Le mATP est un substrat de faible activité pour l'*hexokinase*.

Déshydrogénases

La lactate déshydrogénase et l'octopine déshydrogénase n'acceptent pas le mATP dans les sites de fixation de la partie adénine du coenzyme (NAD) et ne sont donc pas inhibées par le mATP. La glucose-6-phosphate déshydrogénase est inhibée par le mATP comme elle l'est par l'ATP qui se place au site du glucose-6-phosphate.

PUBLICATIONS

B. CROIZAT, M.M. PORTIER, F. BERTHELOT et F. GROS, *Control of gene expression during terminal neurogenesis* (in : *Molecular Biology Approach to the Neurosciences*, H. SOREQ, éd., pp. 11-12. John Wiley and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1984).

J.C. LARCHER, J.L. VAYSSIÈRE, F. BERTHELOT, C. BENLOT, F. GROS et B. CROIZAT, *Is neurogenesis mediated by mitochondrion?* (Colloque « Quo Vadis », Sanofi Recherche, Abstract p. 108, Toulouse, 1985).

Ph. DENOULET et F. GROS, *Expression neurospécifique de gènes β -tubuline chez la souris au cours du développement* (*Biol. Cell*, 52, 114, 1984).

M.M. PORTIER, B. CROIZAT, F. BERTHELOT et F. GROS, *A new inducer of neuroblastoma differentiation : its effects on cellular energetics and cytoskeletal components* (in : *Molecular Biology Approach to the Neurosciences*, H. SOREQ, éd., pp. 43-51. John Wiley and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1984).

M.M. PORTIER, *Preparation and experimental use of polysomes. Run-off of polysomes* (in : *Molecular Biology Approach to the Neurosciences*, H. SOREQ, éd., pp. 154-155. John Wiley and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1984).

M.M. PORTIER, P. BRACHET, B. CROIZAT et F. GROS, *Regulation of peripherin in mouse neuroblastoma and rat PC 12 pheochromocytoma cell lines* (*Dev. Neurosci.*, 6, 215-226, 1984).

K. DELLAGI, A. TABILIO, M.M. PORTIER, W. VAINCHENKER, S. CASTAIGNE, J. GUICHARD, J. BRETON-GORIUS et J.C. BROUET, *Expression of vimentin intermediate filament cytoskeleton in acute non-lymphoblastic leukemias* (*Blood*, 65, 1444-1452, 1985).

M.M. PORTIER, B. DE NÉCHAUD et F. GROS, *Peripherin, a new member of the intermediate filament protein family* (*Dev. Neurosci.*, 6, 335-344, 1984).

N. LAMANDÉ, Y. ZEITOUN, F. GROS et L. LEGAULT, *Regulation of neuron specific enolase isozyme levels during differentiation of murine neuroblastoma cell cultures* (*Neurochem. Int.*, sous presse).

J. MASSOULIÉ, M. VIGNY et M. LAZAR, *Expression of acétylcholinestérase in murine neural cells in vivo and in culture* (in : *Molecular Basis of Nerve Activity*, J.P. CHANGEUX et coll., éd., W. de Gruyter and Co., Berlin, sous presse).

V. HOMBURGER, C. PANTALONI, M. LUCAS, H. GOZLAN et J. BOCKAERT, *β -Adrenergic-receptor repopulation of C₆ glioma cells after irreversible blockade and down regulation* (*J. Cell. Physiol.*, 121, 589-597, 1984).

V. HOMBURGER, H. GOZLAN, R. BOUHELAL, M. LUCAS et J. BOCKAERT, *Irreversible blockade of β -adrenergic receptors with a bromoacetyl derivative of pindolol* (*Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 328, 279-287, 1985).

F. SLADDECZEK, V. HOMBURGER, J.P. MAUGER, H. GOZLAN, M. LUCAS, R. BOUHELAL, C. PANTALONI et J. BOCKAERT, *Turnover of adrenergic receptors under normal and desensitized conditions* (*J. Receptor Res.*, 4, 69-89, 1984).

M. ARLUISON, M. DIETL et J. THIBAUT, *Ultrastructural morphology of dopaminergic nerve terminals and synapses in the striatum of the rat using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. A topographic study* (*Brain Res. Bull.*, 13, 269-285, 1984).

M. DIETL, M. ARLUISON, P. MOUCHET, C. FEURSTEIN, M. MANIER et J. THIBAUT, *Probable presence of dopaminergic neurons intrinsic to the spinal cord of the rat* (*Histochemistry*, 1985, sous presse).

F. BOUILLAUD, D. RICQUIER, G. MORY et J. THIBAUT, *Increase level of mRNA for the uncoupling protein in brown adipose tissue of rats during thermogenesis induced by cold exposure or norepinephrine infusion* (*J. Biol. Chem.*, 259, 11583-11586, 1984).

F. BOUILLAUD, D. RICQUIER, J. THIBAUT et J. WEISSENBACH, *Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue. cDNA cloning of the*

mitochondrial uncoupling protein (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 445-448, 1985).

D. RICQUIER, G. MORY, F. BOULLAUD, J. THIBAUT et J. WEISSENBACH, *Rapid increase of mitochondrial uncoupling protein and its mRNA in stimulated brown adipose tissue : use of a cDNA probe* (*F.E.B.S. Lett.*, 178, 240-244, 1984).

M. POULLET et M. VERDIÈRE, *Histochemical and biochemical studies of cholinesterase in the carotid labyrinth of amphibians* (*Biol. Cell*, 53, 259-262, 1985).

L. NOWAK, P. ASCHER, Y. BERWALD-NETTER et F. COURAUD, *Single channel currents of cultured mammalian astrocytes studied using excised membrane patches* (*Neurosci. Lett.*, suppl. 14, S 264, 1983).

Y. BERWALD-NETTER, T. SHIMAHARA, K. TAKEDA et L. TAUC, *Acetylcholine-activated and voltage-gated ionic currents from neuroblastoma cells* (*J. Physiol.*, London, Abstr. 114 P, 1984).

Y. BERWALD-NETTER, A. KOULAKOFF, L. NOWAK et P. ASCHER, *Ionic channels in glial cells* (in : *Astrocytes*, S. FEDOROFF and A. VERNADAKIS, éd., Academic Press, 1985, sous presse).

Y. GACHE, F. LANDON et A. OLOMUCKI, *Polymorphism of α -actinin from human blood platelets : homodimeric and heterodimeric forms* (*Eur. J. Biochem.*, 141, 57-61, 1984).

D.B. PHO, C. VASSEUR, E. DESBRUYÈRES et A. OLOMUCKI, *Evidence for the presence of tropomyosine in the cytoskeletons of ADP and thrombin-stimulated blood platelets* (*F.E.B.S. Lett.*, 173, 164-168, 1984).

A. OLOMUCKI, C. HUC, F. LEFÉBURE et M. COUÉ, *Isolation and characterization of human blood platelet gelsolin* (*F.E.B.S. Lett.*, 174, 80-85, 1984).

Y. GACHE, F. LANDON, H. TOUITOU et A. OLOMUCKI, *Susceptibility of platelet α -actinin to a Ca^{2+} -activated neutral protease* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124, 877-881, 1984).

E. CARON et C. ORIOL-AUDIT, *Fixation des polyamines biologiques aux filaments d'actine* (*Biol. Cell*, 51, 6 a, 1985).

N.J. GRANT et C. ORIOL-AUDIT, *Influence of the polyamine spermine on the organization of cortical filaments in isolated cortices of *Xenopus laevis* eggs* (*Eur. J. Cell. Biol.*, 36, 239-246, 1985).

F. THOMÉ, D.B. PHO et A. OLOMUCKI, *Bromopyruvate, a potential affinity label for octopine dehydrogenase* (*Biochimie*, 67, 249-252, 1985).

Y. GACHE, F. LANDON et A. OLOMUCKI, *Isoforms of platelet α -actinin* (in : *Muscle and non-muscle cell system : biochemistry, physiology and pathology*, E.E. ALIA, N. ARENA et M.A. RUSSO, édés., Praeger Scientific, New York, 1985, sous presse).

M. COUÉ, C. HUC, F. LEFÉBURE et A. OLOMUCKI, *Properties of a 90 kDa protein-actin complex isolated from human blood platelets* (in : *Muscle and non-muscle system : biochemistry, physiology and pathology*, E.E. ALIA, N. ARENA et M.A. RUSSO, édés., Praeger Scientific, New York, 1985, sous presse).

C. ORIOL-AUDIT, N.J. GRANT et C. AIMAR, *Role of polyamines in cell division of amphibian eggs* (in : *Muscle and non-muscle cell systems : biochemistry, physiology and pathology*, E.E. ALIA, N. ARENA et M.A. RUSSO, édés., Praeger Scientific, New York, 1985, sous presse).

C. ORIOL-AUDIT, *Actin and polyamines : a further approach to the cyto-kinesis mechanism* (in : *Recent progress in polyamine research*, L. SELMECI et N. SEILER, édés., Akademia Kiado, Budapest (Hongrie), 1985, 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* (*Tetrah. Letters*, 25, 3471-3474, 1984).

M. OLOMUCKI, J.Y. LE GALL, P. ROQUES, F. BLOIS et S. COLINART, *Reaction of acetylenic compounds with nucleobases in nucleosides, nucleotides and poly(A)* (*Nucleosides and Nucleotides*, 1985, sous presse).

THÈSES

Thèse de Doctorat de 3^e Cycle

M¹¹^e Y. GACHE, *Mise en évidence du polymorphisme de l' α -actinine de plaquettes humaines et étude de l'interaction des isoformes avec l'actine* (Spécialité « Biologie cellulaire et moléculaire », Université Paris VI, avril 1985).

Diplômes d'Etudes Approfondies

M¹¹^e C. VASSEUR, *Etude comparée des cytosquelettes au cours de l'activation et de l'agrégation des plaquettes sanguines* (Option « Structure et Fonction des Protéines », U.E.R. de Biochimie, Université Paris VI, septembre 1984).

M^{me} F. BLOIS, *Préparation et essais préliminaires de l'activité biologique de nucléotides contenant un noyau adénine modifié* (U.E.R. de Biochimie, Université Paris VI, septembre 1984).

CONFÉRENCES, INVITATIONS, PARTICIPATION A DES CONGRÈS

Le Professeur F. GROS a été invité à donner une série de conférences à l'Université d'Aarhus (Danemark) sur les problèmes de différenciation cellulaire. Il a également donné une conférence sur un thème similaire, sur invitation de l'Académie Royale de Belgique. Il a participé à la Réunion Européenne des Neurosciences (Vars-les-Claux) et aux séminaires franco-britanniques (échange MRC - Institut Pasteur) qui se sont déroulés au laboratoire de Biologie marine à Concarneau. Il a enfin pris part au Colloque organisé par l'O.C.D.E. sur les Biotechnologies (Castel Gandolfo, Italie). Enfin, il a été chargé par le Président de la République d'organiser la 2^e Conférence internationale de Bioéthique qui s'est tenue en avril 1985 au château de Rambouillet. Le Professeur Gros avait été invité à prononcer la conférence générale (« plenary lecture ») au congrès de la F.E.B.S. (Lisbonne, Portugal), mais des ennuis de santé l'ont empêché de s'y rendre.

Le Professeur Gros a été reçu docteur honoris causa de l'Institut Weizmann des Sciences (Rehovot, Israël). Il a été nommé récemment membre du C.O.D.E.S.T., comité pour le développement européen des sciences et des techniques auprès de la communauté européenne.

M. B. CROIZAT a participé au Colloque « Quo Vadis », organisé par Sanofi Recherche, à Toulouse (mai 1985), où il a présenté un « poster » : *Is neurogenesis mediated by mitochondrion?* (J.C. LARCHER, J.L. VAYSSIÈRE, F. BERTHELOT, C. BENLOT, F. GROS et B. CROIZAT).

M^{lle} B. DE NÉCHAUD a donné une conférence : *Etude du cytosquelette dans la maladie d'Alzheimer*, dans le cadre d'une « Série de Séminaires sur les Démences » organisée par l'I.N.S.E.R.M. au centre Paul Broca à Paris, le 5 février 1985.

M. Ph. DENOULET a participé au 2^e Colloque Annuel de la Société de Biologie Cellulaire de France à Paris (septembre 1984), où il a présenté un « poster » : *Expression neuro-spécifique de gènes β -tubuline chez la souris au cours du développement*. Il a donné 5 conférences : 1) *Expression génétique des isotubulines au cours de la neurogenèse in vivo et in vitro chez la souris : implications fonctionnelles*, lors des Journées Scientifiques de l'Institut de Biologie du Collège de France (novembre 1984) ; 2) *Le cytosquelette neuronal* et 3) *Expression des isotubulines au cours de la neurogenèse*, dans

le cadre de l'enseignement « Neurochimie Expérimentale et Clinique » (DERBH) au C.H.U. Pitié-Salpêtrière à Paris (décembre 1984) ; 4) *Expression différentielle des isotubulines au cours de la différenciation des cellules nerveuses*, dans le service de Biologie Cellulaire du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay (janvier 1985) ; 5) *Le cytosquelette du neurone*, dans le cadre des Conférences Associées au D.E.A. de Biochimie de Paris VI « Structure et intégration fonctionnelle des protéines » (mars 1985).

M^{me} M.M. PORTIER a donné deux séminaires sur le thème : *Cytosquelette de la cellule nerveuse*, respectivement à l'Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (janvier 1985), et à l'Institut de Développement et Sénescence Cellulaire, Paris (février 1985).

M. N. LAMANDÉ a participé au 24^e Colloque de la Société Française de Microscopie Électronique, à Montpellier (mai 1984), section « Biology of the Cell », où un « poster » a été présenté : *Three dimensional electron microscopy using quarter-micron sections : a method of investigation for tissue culture studies* (N. KÖNIG, M.J. DRIAN, A. PRIVAT et N. LAMANDÉ).

M^{me} M. LAZAR a participé à l'International Erwin Riesch Symposium on Ectoenzymes (Munich, mai 1984), où une communication a été présentée : *Molecular forms of acetylcholinesterase* (M. VIGNY, M. LAZAR et J. KOENIG).

M^{me} M. LUCAS a participé au Second Basel Workshop of Methodology in Receptor Research (Rheinfelden, mai 1984) où une communication a été présentée : *Turnover of adrenergic receptors under normal and desensitized conditions* (F. SLADCEK, V. HOMBURGER, J.P. MAUGER, H. GOZLAN, M. LUCAS, R. BOUHELAL, C. PANTALONI et J. BOCKAERT).

M^{me} Y. BERWALD-NETTER a été invitée à donner deux conférences : 1) *Neurogenic differentiation and neuronal maturation explored with the aid of neurotoxins*, dans le cadre de la IX^e Conférence en Neurobiologie de Gif (Gif-sur-Yvette, novembre 1984) ; 2) *Ionic channels in mouse brain astrocytes*, dans le cadre d'un Workshop on Glial Cell Development and Function, organisé par l'American Multiple Sclerosis Society, à Seillac, France (avril 1985). Elle a également donné une conférence : *Astrocytes et Neurotransmetteurs*, dans le cadre de l'enseignement de Neurochimie Expérimentale et Clinique, au C.H.U. Pitié-Salpêtrière, Paris.

M. D.B. PHO a présenté une communication à la réunion du Club Français du Cytosquelette, à Banyuls-sur-Mer (juin 1984) : *Comparaison des cytosquelettes de plaquettes non stimulées et stimulées par l'ADP et la thrombine*.

M^{me} Y. GACHE a présenté une communication à la réunion du Club Français du Cytosquelette, à Banyuls (juin 1984) : *Susceptibilité de l' α -actinine des plaquettes sanguines humaines à l'action de la protéase à calcium*.

M^{me} C. ORIOL-AUDIT a été invitée comme conférencière et présidente de séance à l'« International Conference on Polyamines » (6-10 août 1984) à Budapest (Hongrie). Elle a fait une communication au Club Français du Cytosquelette (11-15 juin 1984) à Banyuls : *Action des polyamines sur l'actine de la division des œufs de X. laevis*.

M^{lle} F. LANDON a donné une conférence intitulée : *Polymorphisme de l' α -actinine de plaquettes sanguines humaines* aux Journées de l'Institut de Biologie du Collège de France.

M. M. OLOMUCKI a été invité à donner une conférence : *New methods and new reagents for chemical modification of proteins and nucleic acids* à l'Université de Lodz, Pologne (juillet 1984). Il a participé : 1) à l'I.U.P.A.C. International Symposium on the Chemistry of Natural Products à Poznan (Pologne) où il a présenté une communication orale et un « poster » : *A new reaction of nucleobases, potentially useful for chemical modification of nucleic acids* avec J.Y. LE GALL et S. COLINART (juillet 1984) ; 2) à la 25^e réunion du Groupe d'Etudes de Chimie Organique à Liebfrauenberg (Bas-Rhin) (septembre 1984) ; 3) aux Journées de Chimie Organique à Palaiseau, où il a présenté un « poster » : *Réactions des esters α -acétyléniques avec les nucléobases et les acides nucléiques* avec P. ROQUES, J.Y. LE GALL et S. COLINART (septembre 1984). Il a donné une conférence : *Reaction of acetylenic compounds with nucleobases in nucleosides, nucleotides and poly(A)* à la VIth International Round Table - Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications à la Grande-Motte (Hérault) (octobre 1984).