

Biochimie cellulaire

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

Biochimie de la transformation maligne Etude des séquences oncogéniques

Le cours a été consacré à divers aspects des connaissances touchant à l'apparition de l'état cancéreux, telles que nous permettent de l'appréhender aujourd'hui la biologie moléculaire et la génétique. L'accent a cependant été mis sur la nature et les propriétés des éléments du chromosome auxquels on attribue un rôle privilégié dans le déterminisme des cancers, ce que les biologistes ont dénommé « séquences oncogéniques » (souvent désignées du terme simplifié d'« oncogènes »).

Nous avons rappelé dans un premier temps comment les idées relatives à l'origine de l'état cancéreux ont évolué depuis le début de ce siècle. Le concept de l'origine génétique du cancer a été développé pour la première fois, semble-t-il, par T. Boveri en 1900. Depuis lors, toute une série de théories ont été émises pour expliquer la transformation d'un tissu sain en tissu cancéreux, privilégiant tel ou tel mécanisme cellulaire ou biochimique plutôt qu'en lui attribuant une importance exclusive. Il s'agit de théories dites « mutationnistes » (le cancer provient d'une ou plusieurs mutations somatiques), « virales », ou encore ontogéniques (le cancer est une maladie du développement avec résurgence de caractéristiques embryonnaires), voire métaboliques (ex. : modification des propriétés respiratoires cellulaires) etc. Au fil de ces réflexions, ont été précisées certaines des particularités de la cellule cancéreuse telles que le caractère désordonné de la croissance et surtout la transplantabilité : la découverte de substances chimiques issues du goudron (hydrocarbures à activité cancérogène) a ouvert la voie à la carcinogénèse chimique en facilitant l'étude des mécanismes déclencheurs. L'une des notions les plus importantes qui en ont découlé est relative à la nécessité d'effets multiples et coopératifs dans l'apparition de l'état malin. Ainsi en est-il des effets « promoteur » et « inducteur » qui distinguent les actions cancérogènes de diverses substances présentes dans l'environnement.

Les diverses hypothèses explicatives du cancer tendent à converger vers un schéma plus unitaire, selon lequel les cancers résultent d'altérations génétiques, spontanées ou induites, deux événements distincts devant survenir à minima pour que l'état néoplasique déclenché se perpétue. Dans certains cas, les mutations peuvent survenir au sein des cellules germinales, ce qui a pour conséquence le caractère héréditaire de quelques types de cancers (ex. : rétinoblastomes), et explicite la notion plus ou moins empirique de cancers « familiaux ». La plupart du temps, cependant, ces altérations surviennent dans le matériel génétique de tissus somatiques et ne sont donc pas transmissibles. L'étiologie virale de cancers animaux est reconnue de longue date. Celle des cancers humains est d'observation plus récente. Les principaux types de virus à effet cancérigène (virus oncogènes) sont passés en revue dans cette première partie du cours, en insistant sur deux notions capitales : celle de « *transformation* » *maligne*, état pseudo-cancéreux acquis par certaines cellules animales infectées par des virus cancérigènes en conditions non permissives, et qui relève de l'action de certains gènes de cancer (ou « oncogènes ») présents dans le matériel génétique de certains de ces virus, et celle de *provirus*, état de perpétuation sous lequel peut exister, dans le chromosome d'une cellule infectée, le génome d'un virus oncogène non-activé. La classe des rétrovirus, ou virus oncogènes à ARN, propageables à la faveur d'une transcriptase reverse, et véhiculables à l'état de provirus à ADN, fait l'objet d'une attention spéciale.

En effet, l'étude comparée des rétrovirus dits « rapides » (ou aigus) et « lents » a bien mis en relief l'importance et le rôle des séquences oncogènes dans la transformation et l'acquisition de l'état malin.

En 1976, Stehelin, Varnus et Bishop ont découvert l'existence, d'abord au sein des génomes de cellules aviaires, puis dans toutes les espèces eucaryotiques (à l'exclusion des espèces végétales), d'une catégorie nouvelle de déterminants génétiques, appelés oncogènes cellulaires (en abrégé c-onc), dont les séquences chimiques sont très voisines de celles de certains oncogènes viraux (ou v-onc).

Cette découverte a eu des retentissements considérables tant au niveau de la compréhension des mécanismes mutationnels qui sont à l'origine des cancers et de celle de l'origine des virus oncogènes eux-mêmes que, plus généralement, des mécanismes de la communication intercellulaire et de son dérèglement.

Près d'une quarantaine « d'oncogènes cellulaires » sont aujourd'hui connus. Après avoir discuté des principales approches techniques qui en permettent la mise en évidence, nous nous sommes principalement attaché à la nature des produits dont ils déterminent la formation dans la cellule, ainsi qu'aux mécanismes activateurs qui déclenchent, au niveau de ces oncogènes cellulaires, l'apparition des diverses formes de cancers.

Les produits issus de l'activité des oncogènes sont fort variables : protéines kinases, facteurs G, facteurs de croissance, récepteurs. L'étude de ces produits suggère fortement que les oncogènes cellulaires tiennent sous leur commande des substances intervenant dans un cycle d'événements qui assurent la *transduction* des signaux exogènes (intracellulaires) depuis le milieu jusqu'au noyau de la cellule. Cette interprétation est confortée par les très nombreuses études réalisées depuis peu sur le métabolisme des phosphoinositides. On sait en effet que l'interaction d'un facteur de croissance avec son récepteur membranaire déclenche une séquence d'événements selon une cascade temporelle qui commence à être bien connue : hydrolyse (facteur G dépendante) des phosphoinositides par la phospholipase C en inositol 3 phosphate (InsP3) et diacylglycérolphosphate ; libération par InsP3 des ions Ca^{++} à partir de vésicules riches en Ca^{++} et interaction du diacylglycérolphosphate avec la protéine kinase C, suivie de la phosphorylation d'un ensemble d'effecteurs parmi lesquels figure l'échangeur de protons, etc. Ces événements culminent dans une activation des processus mitotiques. On comprend qu'un changement dans l'activité d'un des oncogènes gouvernant la formation de ces divers intermédiaires réactionnels provoque un dérèglement dans la transmission des signaux mitogéniques et que la cellule ainsi modifiée échappe au contrôle normalement exercé par le milieu environnant et, notamment, par les autres cellules. Reste à comprendre comment surviennent ces changements d'activité. Le cours passe en revue les événements qui peuvent entraîner « l'activation » des oncogènes cellulaires. Ces événements sont multiples : réarrangements chromosomiques consécutifs à des phénomènes de translocation tels qu'on peut les observer au niveau du gène *myc* lors de l'apparition des lymphomes de Burkitt ou au niveau du gène *abl*, mutations ponctuelles entraînant la formation d'un produit aberrant (ex. : mutation du gène *ras* accompagnant l'apparition des cancers de la vessie) ou encore amplification de certains oncogènes se traduisant par une surabondance des produits effecteurs correspondants (ex. : amplification du gène *N-myc* associé aux formes tardives du cancer du col). Dans d'autres cas, par exemple, après insertion d'un provirus de rétrovirus à type lent en amont d'une séquence oncogène cellulaire, on peut assister à l'activation de cette dernière (cancers déclenchés par le virus de l'érythroblastose aviaire).

Une observation rejoignant les premières constatations relatives au caractère multifactoriel des cancers et à la nécessité de deux mutations pour la survenue de ces derniers consiste dans la mise en évidence du phénomène de coopération oncogénique (F. Cuzin et coll. ; Weinberg et coll.). Il apparaît en effet que l'acquisition de l'état malin par une cellule en culture requiert la participation de deux oncogènes : l'un provenant de la catégorie de ceux dont les modifications entraînent l'acquisition de l'état transformé et l'autre de celle dont l'activation provoque l'immortalisation de la cellule. La coopération peut être observée sous les effets conjoints de deux virus portant chacun un oncogène de l'une des deux catégories, ou entre un oncogène cellulaire

modifié de l'une des deux catégories et un virus comportant un oncogène de l'autre, etc. Que la coopération soit également de règle *in vivo* émane des observations de D. Stehelin : un virus oncogène peut entraîner directement l'apparition de l'état malin lorsqu'il comporte deux oncogènes de l'une et l'autre des catégories susmentionnées (ex. : virus des cancers de la neuro-rétine).

Dans la dernière partie du cours, nous nous sommes intéressé aux modalités d'activation des oncogènes cellulaires soit au cours des phases précoces de l'entrée en cycle de division (ex. : activation des gènes *fos* et *myc*), soit au cours de la différenciation terminale (ex. : gène *src* activé aux phases tardives de la neurogenèse). Enfin, l'influence de séquences *c-onc* introduites de façon stable dans le génotype des souris transgéniques a également été analysée en examinant les conséquences qui en résultent pour la formation spécifique de certains tissus.

F.G.

SÉMINAIRES

Les séminaires ont porté sur le sujet du cours. Les thèmes suivants ont été traités :

J. POUYSSEGUR (Centre de Biochimie, Université de Nice), *Facteurs de croissance et contrôle de la division. 1) Signaux ioniques. 2) Mécanismes de transduction.*

M. FISZMANN (Institut Pasteur, Paris), *Interactions entre proto-oncogènes et différenciation cellulaire.*

F. CUZIN (Centre de Biochimie, Université de Nice), *Coopération entre oncogènes et progression tumorale. 1) Systèmes modèles en culture de cellules. 2) Souris transgéniques.*

R. MONIER (Institut de Formation Supérieure BioMédicale, Villejuif), *Oncogènes et tumeurs humaines.*

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

BIOCHIMIE CELLULAIRE

Les récepteurs cholinergiques muscariniques des neurones centraux en culture
(C. ANDRÉ, A. KOULAKOFF, E. HOUZET et Y. BERWALD-NETTER)

L'objectif principal de cette étude est d'explorer le rôle des interactions cellulaires et des effecteurs moléculaires dans l'expression des récepteurs

cholinergiques muscariniques (mAChR) et, en particulier, dans la genèse de leur diversité. Pour cela, nous avons entrepris une analyse pharmacologique quantitative et qualitative des mAChR au cours de la maturation en culture des neurones dérivés soit du cerveau total de la souris soit d'aires cérébrales choisies. A titre comparatif, l'analyse des mAChR dans les tissus homologues a été effectuée à des phases différentes du développement ontogénique.

La liaison de $^3\text{H-N-méthyl-scopolamine}$ (NMS) — antagoniste muscarinique spécifique et non sélectif des sous-classes de mAChR — a été pratiquée sur des préparations membranaires pour estimer l'abondance des mAChR. Des essais de déplacement du $^3\text{H-NMS}$ par les agonistes carbachol ou pirenzépine ont servi pour caractériser les sous-classes de mAChR. Les anticorps monoclonaux anti-mAChR M35 (produits contre les récepteurs purifiés) (André et coll., 1983, 1984) ont été utilisés pour visualiser par immunocytochimie les cellules riches en mAChR.

Nous avons observé que les neurones dérivés du cerveau fœtal de souris expriment en culture des récepteurs cholinergiques muscariniques dont les propriétés sont semblables à celles des mAChR *in vivo* : une seule population de sites de liaison pour l'antagoniste $^3\text{H-NMS}$ ($K_D = 4.8 \times 10^{-10}$ M) ; des sites à haute (RH) et basse (RL) affinité pour l'agoniste carbachol (K_D RH = 1.2×10^{-6} M ; K_D RL = $0.6.1 \times 10^{-4}$ M). Les sites RH représentent 25 ± 10 % des mAChR dans les cultures de neurones (cf. 20-25 % *in vivo*). Le rapport RH/RL varie peu au cours de la maturation des neurones *in vivo* ou en culture. Le nombre des mAChR augmente au cours de la maturation des neurones *in vitro* en suivant un profil sigmoïdal, très proche sur le plan temporel et quantitatif de celui observé *in vivo*.

L'emploi en immunofluorescence des anticorps monoclonaux M35 sur les cultures des neurones centraux a permis d'identifier la présence d'une sous-population riche en mAChR au niveau du soma et des neurites.

L'analyse des cultures dérivées de différentes aires cérébrales est en cours.

Etude de la neurogenèse in vitro. Expression des oncogènes au cours de la neurogenèse. Régulations de l'expression génétique de la mitochondrie.

(B. CROIZAT, F. BERTHELOT, J.L. VAYSSIÈRE, J.C. LARCHER, L. CORDEAU et M. BASSEVILLE)

1. *Etude de la neurogenèse in vitro*

Nous avons mis au point un nouveau système de cultures primaires de neurones. Les cortex sont prélevés au 15^e jour de la vie fœtale du rat. Ces cultures sont nettement plus reproductibles que celles obtenues à partir de la souris et permettent la survie des neurones pendant 60 jours au moins.

Nous avons suivi l'évolution de nos marqueurs neuronaux, mitochondriaux et cytosquelettiques au cours du développement spontané des cultures. Nous allons tester l'effet de divers agents neurotropes.

2. *Expression des oncogènes au cours de la neurogenèse*

Cette étude s'articule sur trois systèmes :

- 1) le cortex de souris prélevé à différents stades du développement,
- 2) les cultures primaires de neurones,
- 3) le neuroblastome induit par le CCA ou d'autres agents.

Les sondes utilisées sont c-myc, c-fos et c-sarc. Les premiers résultats révèlent une augmentation notable de l'hybridation avec c-fos entre 45 et 120 min, suivant l'addition de CCA aux cultures de neuroblastome.

3. *Régulations de l'expression génétique de la mitochondrie*

Grâce à divers inhibiteurs utilisés séparément ou simultanément, nous avons déterminé les interactions entre les génomes nucléaire et mitochondrial dans la synthèse des complexes protéiques mitochondriaux.

En parallèle, nous procédons à une étude du déterminisme moléculaire de certains types de myopathies mitochondriales.

Nous avons montré ainsi, sur électrophorèses mono- et bidimensionnelle d'extraits de mitochondries, que la sous-unité 4 de la cytochrome c oxydase est absente dans le muscle de certains patients.

Expression des isotubulines au cours de la neurogenèse chez la souris

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

Le tissu nerveux exprime, en plus des isotubulines communes trouvées dans tous les types cellulaires de l'individu, un grand nombre d'isotubulines neurospécifiques qui apparaissent et s'accumulent progressivement au cours du développement, représentant ainsi d'excellents marqueurs des étapes précoces et tardives de la différenciation nerveuse.

Nous avons récemment montré que l'expression de ces isotubulines était contrôlée à un double niveau : transcriptionnel pour les isoformes $\alpha 1$, $\beta'1$, $\beta 3$ et $\beta 4$, et post-traductionnel pour les isoformes $\beta'2$, α et β acides.

Six RNA messagers β -tubuline distincts (par la taille, les critères d'expression, l'isotubuline codée) ont été caractérisés dans le cerveau adulte. Quatre d'entre eux sont d'expression neurospécifique (un précoce et trois tardifs). Il

sera recherché si des événements post-transcriptionnels interviennent dans la production de ces RNA messagers.

En ce qui concerne le niveau post-traductionnel, nous avons montré que des événements de phosphorylation et d'acétylation étaient impliqués dans la synthèse des isoformes β^2 , et α et β acides.

Par l'étude du transport axonal des isotubulines dans le nerf sciatique (en collaboration avec L. Di Giamberardino et G. Filliatreau, C.E.N., Saclay), il a été montré que ces modifications post-traductionnelles jouaient un rôle essentiel dans la dynamique des microtubules de l'axone et dans leur transport.

En outre, grâce à l'utilisation de populations virtuellement pures de cellules neuronales et gliales en culture primaire (en collaboration avec Y. Berwald-Netter et A. Kouladoff), nous avons démontré que le haut degré de polymorphisme tubuline observé dans le tissu nerveux était presque exclusivement le fait des neurones, les cellules gliales quant à elles n'exprimant qu'un spectre réduit d'isotubulines. Les neurones, après plus d'un mois en culture, expriment la totalité des isotubulines trouvées dans un cerveau adulte.

Ces populations virtuellement pures de neurones, qui se différencient totalement en conditions *in vitro*, représentent un système de choix pour étudier précisément les mécanismes d'expression des isotubulines et leur contrôle.

Contrôle de l'expression génétique des émolases cérébrales au cours du développement du cerveau de souris

(L. LEGAULT-DÉMARE avec C. KABAKTCHIS, N. LAMANDÉ, M. LAZAR et M. LUCAS)

L'un des événements marqueurs de la maturation neuronale est la transition entre l'émolase embryonnaire $\alpha\alpha$ et l'émolase $\gamma\gamma$ spécifique des neurones adultes.

Pour progresser dans l'analyse des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression différentielle des gènes α et γ au cours du développement, nous avons précédemment cloné des ADNs complémentaires correspondants. Nous avons ensuite :

1) établi que, durant l'ontogenèse du cerveau de souris, les niveaux respectifs des séquences ARN α et γ constituent l'élément déterminant dans le contrôle de l'expression des émolases spécifiques des neurones, $\alpha\gamma$ et $\gamma\gamma$, et de l'émolase ubiquitaire $\alpha\alpha$. En collaboration avec Y. Netter, la même étude a été étendue à un système modèle de cultures primaires de neurones.

L'apport conjoint des techniques d'hybridation *in situ* et d'immuno-cytochimie aidera à compléter ces études.

2) établi la séquence complète de l'ARN α et, en grande partie, celle de l'ARN γ . Cette analyse a révélé l'existence d'une grande homologie entre les séquences codantes de ces deux ARNs, en accord avec l'hypothèse d'un gène ancestral commun. Les séquences 3' non-codantes respectives de ces mêmes ARNs sont hétérologues et se distinguent, en outre, par leurs tailles, celle de l'ARN γ spécifique des neurones étant 2 fois plus longue que celle de l'ARN α d'expression ubiquitaire.

La caractérisation des gènes α et γ dans une banque génomique de souris est en cours et sera suivie par l'analyse de séquence d'abord des régions 5' de ces gènes. Cette étape permettra de réaliser des expériences de transfection afin de rechercher les éléments de structure des gènes α et γ , et les facteurs cellulaires responsables de l'expression distincte de ces gènes au niveau tissulaire, cellulaire et au cours du développement.

Expression de la périphérine, protéine de filament intermédiaire spécifique des neurones du système nerveux périphérique, au cours du développement embryonnaire

(M.M. PORTIER, M. ESCURAT, F. LANDON, C. HUC, avec la collaboration de M. GUMPEL et F. DE LA CHAPELLE, Unité I.N.S.E.R.M. 134, Hôpital de la Salpêtrière)

Nous avons décrit une protéine spécifique des neurones du système nerveux périphérique, appelée périphérine pour cette raison, et démontré qu'il s'agissait d'une protéine de filament intermédiaire.

L'obtention d'un anticorps polyclonal dirigé contre cette protéine et ne présentant aucune réaction croisée avec une autre protéine et, en particulier, avec aucune autre protéine de filament intermédiaire, nous a permis de vérifier, à l'échelle cellulaire, par des techniques d'immunohistochimie, les résultats obtenus jusqu'alors par des méthodes biochimiques, et de confirmer ainsi la spécificité de cette protéine, dont l'expression est bien restreinte aux neurones du système nerveux périphérique ou, plus exactement, aux neurones sensoriels et sympathiques originaires de la crête neurale.

Ces résultats nous ont permis d'entreprendre l'étude de l'expression de la périphérine au cours du développement embryonnaire du rat par des techniques d'immunohistochimie. Les embryons prélevés à différents stades de leur développement ont été coupés au cryostat et la présence de périphérine a été révélée au moyen de son anticorps.

Les résultats obtenus montrent que :

- 1) la périphérine n'est pas exprimée dans les cellules de la crête neurale dès sa formation et pendant leur migration ;
- 2) elle est exprimée dans les neurones des ganglions sensoriels d'abord, puis des ganglions sympathiques lorsque les cellules de la crête neurale susceptibles de se différencier en voie neuronale ont atteint leur destination.

Ce marqueur nous permet donc de suivre la mise en place des systèmes sensoriel et sympathique. Ceci représente un résultat particulièrement important pour le système nerveux sensoriel pour lequel on n'avait décrit jusqu'à présent aucun marqueur spécifique.

Etude des enzymes de la voie de synthèse des catécholamines

(J. THIBAUT, M. KRIEGER-POULLET, D. PIGEON, E. BONNEFOY et F. COGÉ)

1. *Tyrosine hydroxylase (TH)*

Il y a quelques années, nous avons mis au point au laboratoire une méthode de purification de la TH à partir de tumeurs (phéochromocytomes) transplantables chez le rat. Ceci nous a permis d'obtenir des quantités pondérables d'enzyme très purifiée. Avec la TH, nous avons copurifié une protéine kinase permettant de phosphoryler la TH. A l'aide d'une chromatographie sur phospho-Ultrogel, nous avons pu séparer les deux protéines et obtenir, d'une part, de la TH sans kinase et, d'autre part, des protéines contenant une activité kinase capable de rephosphoryler la TH.

Dans un tout autre domaine, nous avons étudié le rôle de l'extrémité N-terminale de la TH dans la régulation de son activité enzymatique, ceci au cours d'une hydrolyse trypsique ménagée et à l'aide d'un anticorps monoclonal dont nous avons localisé l'épitope sur les 20 premiers acides aminés de la molécule. Cet anticorps nous a permis aussi de mettre en évidence chez l'homme deux formes de TH, de masses moléculaires différentes.

2. *DOPA-décarboxylase (DDC)*

L'étude de la DDC de rat à l'aide de l'anticorps anti-DDC de porc (protéine obtenue grâce à une collaboration avec M^{me} C. Borri-Voltattorni, Perugia, Italie), nous a permis de mener à bien sa purification et de déterminer le poids moléculaire de la sous-unité catalytique. Nous avons démontré que la DDC de rat se présente comme un homodimère de 50 kD.

3. *Expression génétique de la DDC*

La traduction des ARNm extraits de phéochromocytome ou de rein de rat nous a permis de mettre en évidence, par traduction *in vitro* dans un lysat de

réticulocytes, une protéine néosynthétisée de 50 kD dans le phéochromocytome et de 45 kD dans le rein. La sélection des différents messagers soit sur gradient en présence de formamide, soit sur gel d'agarose en présence de méthyl-mercure, suivie de leur traduction dans les conditions précitées, nous a conduits à mettre en évidence deux messagers de tailles différentes.

CYTOSQUELETTE ET MOTILITÉ

L'U.A. 521 du C.N.R.S. (M^{me} A. OLOMUCKI) a poursuivi cette année l'étude des facteurs protéiniques susceptibles de moduler l'état structural de l'actine dans les cellules.

I. Gelsoline des plaquettes sanguines humaines

(C. HUC, F. LEFÉBURE et A. OLOMUCKI)

Nous avons précédemment isolé et purifié la gelsoline de la plaquette sanguine. Tout comme les gelsolines des autres sources la gelsoline plaquettaire, en présence de calcium, donne des complexes avec l'actine-G, accélère sa polymérisation, se fixe aux bouts à croissance rapide des filaments et est capable de fragmenter ces derniers. En présence d'EGTA, ces effets persistent mais sont plus faibles.

Nous avons dénombré plusieurs formes de gelsoline plaquettaire, séparables par électrofocalisation dans l'urée et réagissant toutes positivement avec l'anticorps anti-gelsoline du plasma sanguin. Toutes ces formes sont capables de fixer l'actine-G marquée à l'I¹²⁵, en présence et en absence de calcium. Les profils peptidiques des trois formes majeures qui ont subi chacune une protéolyse ménagée (V₈ et α -chymotrypsine) se sont avérés très voisins. Ces différentes formes de gelsoline ne devraient donc pas être des produits de gènes différents, mais résulteraient de modifications post-traductionnelles. D'autre part, la gelsoline ne semble pas contenir d'isoformes différant par leur sensibilité au Ca⁺⁺.

II. Etude de la caldesmone de type non-musculaire

(D.P. PHO et E. DESBRUYÈRES)

Nous avons poursuivi l'étude de la caldesmone que nous avons mise en évidence, avec la tropomyosine, dans le cytosquelette de plaquettes activées et agrégées.

L'utilisation de différents inhibiteurs de protéases au cours de la caractérisation de cette protéine et l'analyse des cartes peptidiques confirment qu'elle est

bien distincte de la caldesmone de muscle lisse et qu'elle appartient à la classe des caldesmones de faible poids moléculaire (71-77 kDa) décelées dans d'autres cellules non-musculaires.

Le rôle de la caldesmone s'avère important dans le fonctionnement des protéines contractiles des cellules non-musculaires — en relation, en particulier, avec la tropomyosine — comme l'ont montré des travaux récents. Nous avons cherché si cette notion peut être généralisée et si la caldesmone existe dans d'autres cellules du sang possédant la tropomyosine et présentant des possibilités de modifications morphologiques importantes et rapides. Après avoir purifié l'anti-caldesmone par fixation sur un « électroblot » de caldesmone plaquettaire, nous avons pu démontrer l'existence d'une caldesmone du même type dans les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles. D'autres résultats suggèrent que cette caldesmone existe aussi dans les érythrocytes, où la présence de tropomyosine en faible proportion a été démontrée par d'autres auteurs.

III. Protéine sérique du transport de vitamine D (Gc ou DBP)

(C. DUBORD, J. CONSTANS et A. OLOMUCKI)

L'intérêt de cette protéine est qu'elle fixe l'actine-G avec une grande affinité et, conjointement avec la gelsoline plasmique, élimine les filaments d'actine du flot sanguin (nos travaux précédents). La DBP existe sous trois formes alléliques majeures, dont deux contiennent l'acide sialique. Cette protéine a été identifiée également à la surface de certaines cellules telles que les lymphocytes B et T. On ne connaît pas encore la signification de cette présence. Il a été tout récemment proposé qu'un allèle de DBP contenant deux molécules d'acide sialique pourrait être impliqué dans l'infection virale et, en particulier, dans celle du virus HIV. On ne connaît encore ni le mécanisme de cette action ni le rôle éventuel que pourrait y jouer l'association DBP-actine. Ces circonstances ajoutent beaucoup d'intérêt à l'étude structurale de cette protéine, tant seule qu'associée à d'autres macromolécules. Il nous a donc semblé d'autant plus utile de poursuivre les essais de croissance cristalline de DBP et de son complexe avec l'actine. Tout récemment nous avons réussi à cristalliser ce dernier.

CHIMIE BIOORGANIQUE

L'équipe de M. OLOMUCKI a poursuivi l'étude de la modification chimique des bases des acides nucléiques à l'aide des esters α -acétyléniques.

Evaluation de la conformation des acides nucléiques par une méthode chimique
(P. ROQUES)

L'application de notre méthode de modification chimique aux acides nucléiques a révélé les propriétés intéressantes de cette réaction. Lorsque les nucléobases sont insérées dans un polymère à empilement de bases régulier, elles conduisent à des dérivés différents de ceux qui se forment dans le cas de petites molécules (nucléosides ou nucléotides). Par contre, on obtient ces derniers si les acides nucléiques ont une conformation désordonnée avec les bases désempilées. Cette relation entre la structure des polynucléotides et la réactivité des bases s'observe de façon particulièrement spectaculaire dans le cas du poly(A), qui subit au cours de la modification chimique une déstructuration progressive, comme en témoignent des mesures physico-chimiques (dichroïsme circulaire, température moyenne de dénaturation). Ce changement de conformation se manifeste par la nature des dérivés de l'adénine formés : à ceux caractéristiques d'une conformation ordonnée, obtenus au début de la réaction, succèdent des dérivés correspondant à une structure à bases désempilées qui se forment dans les phases ultérieures de la modification chimique.

Cette corrélation entre la structure des acides nucléiques et celle des dérivés des nucléobases formés s'observe également dans le cas du tRNA^{Phe}. La modification chimique affecte la boucle de l'anticodon, à empilement des bases normal, et l'extrémité 3'-OH à bases non empilées. Les dérivés de l'adénine formés dans ces deux régions sont différents et correspondent bien aux différences de conformation de ces zones du tRNA.

Interaction entre le tRNA et l'aminoacyl-tRNA synthétase correspondante
(F. THOMÉ et P. ROQUES)

La modification chimique du tRNA par l'ester chlorotétrolique, $\text{ClCH}_2\text{-C}\equiv\text{C-COOR}$, introduit des fragments alkylants dans la boucle de l'anticodon et le bras aminoacyle. Il devient ainsi possible d'étudier l'interaction du tRNA avec l'aminoacyl-tRNA synthétase correspondante. Nos essais avec la phénylalanyl-tRNA synthétase (aimablement offerte par le professeur J.P. Ebel) ont montré qu'à pH 9 le tRNA^{Phe} s'attache irréversiblement à l'enzyme. Nous cherchons actuellement à identifier la ou les sous-unités de la synthétase impliquées dans la formation de ce complexe.

PUBLICATIONS

L. NOWAK, P. ASCHER et Y. BERWALD-NETTER, *Ionic channels in mouse astrocytes in culture* (*J. Neurosci.*, 7, 101-109, 1987).

N. MARTIN-MOUTOT, P. CAU, Y. BERWALD-NETTER et F. COURAUD, *Early appearance of cells bearing Na⁺ channels in developing mouse brain. A*

quantitative analysis using light microscopic autoradiography (*Dev. Brain Res.*, 32, 43-51, 1987).

J.L. VAYSSIÈRE, J.C. LARCHER, F. BERTHELOT, C. BENLOT, F. GROS et B. CROIZAT, *Effects on mitochondrial metabolism of CCA, one inducer of neuroblastoma differentiation* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 140, 789-795, 1986).

J.L. VAYSSIÈRE, J.C. LARCHER, F. GROS et B. CROIZAT, *Changes in the subunit of mitochondrial F_1 ATPase during neurogenesis* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, sous presse, 1987).

Ph. DENOULET, B. EDDÉ et F. GROS, *Differential expression of several neurospecific β -tubulin mRNA's in the mouse brain during development* (*Gene* 50, 289-297, 1986).

B. EDDÉ, B. DE NÉCHAUD, Ph. DENOULET et F. GROS, *Control of isotubulin expression during neuronal differentiation of mouse neuroblastoma and teratocarcinoma cell lines* (*Dev. Biol.*, sous presse, 1987).

M. LAZAR, M. LUCAS, N. LAMANDÉ, L.G. BISHOP, F. GROS et L. LEGAULT-DÉMARE, *Isolation of murine neuron-specific and non-neuronal enolase cDNA clones* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141, 271-277, 1986).

A. LILIENBAUM, V. LEGAGNEUX, M.M. PORTIER, K. DELLAGI et D. PAULIN, *Vimentin gene : expression in human lymphocytes and in Burkitt's lymphoma cells* (*EMBO J.*, 5, 2809-2814, 1986).

K. DELLAGI, M. LIPINSKI, D. PAULIN, M.M. PORTIER, G.M. LENOIR et J.C. BROUET, *Characterization of intermediate filaments expressed by Ewing tumor cell lines* (*Cancer Res.*, 47, 1170, 1987).

E. HIRSH, M. RUBERG, M.M. PORTIER, M. DARDENNE et Y. AGID, *Characterization of two antigens in Parkinsonian Lewy bodies* (*Brain Res.*, 345, 374-378, 1987).

M.M. PORTIER, M. ESCURAT, F. LANDON, A. POUPLARD-BARTHELAIX et F. GROS, *Peripherin, an intermediate filament protein specific to the neurons of the peripheral nervous system* (in : *Peripheral Neuropathies*, sous presse).

F. DE VITRY, M. HAMON, J. CATELON, M. DUBOIS et J. THIBAUT, *Serotonin initiates and autoamplifies its own synthesis during mouse central nervous system development* (*Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 83, 8629-8633, 1986).

M.F. FRANZONI, J. THIBAUT, A. FASOLO, M.G. MARTINOLI, F. SCARANARI et A. CALAS, *Organization of tyrosine-hydroxylase immunopositive neurons in the brain of the crested newt, Triturus cristatus carnifex* (*J. Comp. Neurol.*, 251, 121-134, 1986).

O. KAH, J.G. DULKA, P. DUBOURG, J. THIBAUT et R.E. PETER, *Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish : existence of dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway* (*Neuroendocrinology*, 45, 451-458, 1987).

Y. TILLET, J. THIBAUT et M.P. DUBOIS, *Immunocytochemical demonstration of the presence of catecholamine and serotonin neurons in the sheep olfactory bulb* (*Neuroscience*, 20, 1011-1022, 1987).

M.F. FRANZONI, M.G. MARTINOLI et J. THIBAUT, *Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the crested newt. An electron microscopic study* (*Bas. Appl. Histochem.*, 31, 63-72, 1987).

D. PIGEON, P. FERRARA, F. GROS et J. THIBAUT, *Rat pheochromocytoma tyrosine hydroxylase is phosphorylated on serine 40 by an associated protein. kinase* (*J. Biol. Chem.*, 262, 6155-6158, 1987).

M. COUÉ, J. CONSTANS et A. OLOMUCKI, *Effects of serum vitamin D-binding protein on actin in the presence of plasma gelsolin* (*Eur. J. Biochem.*, 160, 273-277, 1986).

C. DUBORD, A. DUCRUIX, J. CONSTANS et A. OLOMUCKI, *Crystallization on human serum vitamin D - binding protein and first crystallographic parameters obtained by X-ray diffraction* (*J. Muscle Res. Cell Motil.*, 8, 88, 1987).

C. HUC, F. LEFÉBURE et A. OLOMUCKI, *Interaction of human blood platelet gelsolin with actin ; calcium sensitivity* (*J. Muscle Res. Cell Motil.*, 8, 88, 1987).

D.B. PHO, E. DESBRUYÈRES, E. DER TERROSSIAN et A. OLOMUCKI, *Analysis of the cytoskeleton of resting and stimulated blood platelets* (*J. Muscle Res. Cell Motil.*, 8, 88, 1987).

F. THOMÉ, F. BLOIS, A. OLOMUCKI et M. OLOMUCKI, *Reactions of nucleic acid bases with α -acetylenic esters. II. Synthesis and enzymatic evaluation of chemically modified nucleotides* (*Eur. J. Biochem.*, 162, 433-437, 1987).

P. ROQUES et M. OLOMUCKI, *Reactions of nucleic acid bases with α -acetylenic esters. III. Chemical modification of poly (A) and poly (C)* (*Eur. J. Biochem.*, sous presse).

THÈSES

Thèse de Doctorat en Biochimie

M. J.L. VAYSSIÈRE, *Aspects biochimiques de la différenciation de la cellule neuronale. Etude des protéines du cytosquelette et de la mitochondrie* (Université Paris VII, 1986).

Diplôme d'Etudes Approfondies

M. F. COGÉ, *Etude de la L-DOPA-décarboxylase de rat. Purification et analyse immunologique* (Université Paris-Val-de-Marne (Paris XII), septembre 1986).

CONFÉRENCES, INVITATIONS, PARTICIPATIONS A DES CONGRÈS

Le Professeur F. GROS a donné une conférence sur « Les propriétés du neuro-cytosquelette » à l'occasion du Symposium Européen organisé par la F.E.B.S. à Berlin (août 1986). Invité par la Chambre de Commerce d'Osaka (novembre 1986), il a prononcé trois conférences : l'une sur « L'avenir du Japon dans le domaine des Sciences Biologiques et des Biotechnologies », l'autre à Suntory sur « Les Biotechnologies en Europe », la troisième, dans le laboratoire du Professeur Numa (Université de Kyoto), intitulée « Différenciation neuronale et cytosquelette ». Invité en février 1987 par la National Academy of Sciences (Washington) et par l'Ambassade de France aux Etats-Unis, il a prononcé une conférence sur le thème « Science Policy in France », et donné un séminaire dans le laboratoire du Professeur M. Nirenberg (N.I.H., Bethesda, Md) intitulé : « Molecular aspects of neurogenesis ». Lors du colloque général organisé par l'I.N.S.E.R.M. à la Sorbonne, il a été invité à faire l'exposé de synthèse sur le thème « Mécanismes de signalisation génétique ». En mars 1987, il a fait partie de la Délégation Scientifique de l'Institut Pasteur qui s'est rendue en Israël (Institut Weizmann des Sciences) à l'occasion du 11^e Colloque Pasteur-Weizmann, et y a donné une conférence sur « Les Mécanismes de signalétique transcriptionnelle et post-traductionnelle au cours de la différenciation neuronale ». En avril 1987, sur l'invitation de l'Agence des Sciences et de la Fondation du Japon, il a pris part à la « Wise Men Conference », et présenté une communication à Londres sur « Les mécanismes de l'expression génétique ». En mai 1987, il s'est rendu aux Etats-Unis sur l'invitation du NIH (Bethesda, Md), à l'occasion des célébrations du centenaire de l'Institut Pasteur et du NIH. Il y a prononcé une conférence sur le thème « Molecular aspects of myogenesis ».

M^{me} Y. BERWALD-NETTER a été invitée à donner une conférence : *Voltage-gated ionic channels in mammalian astroglia*, dans le cadre du 6^e Meeting de la Société Européenne de Neurochimie, à Prague, Tchécoslovaquie (septembre 1986). Elle a donné deux séminaires : 1) *Développement des canaux Na⁺ voltage-dépendants in vivo et en culture*, à l'Institut Pasteur sur l'invitation du Prof. D. Strosberg (novembre 1986) ; 2) *Ontogenèse et maturation des cellules nerveuses. Etude à l'aide de neurotoxines*, à l'Institut Curie sur l'invitation du Prof. W.H. Friedman (février 1987). Elle a également participé à la 59^e Table Ronde Roussel-Uclaf « Structure, Mechanism and Regulation of Ionic Channels » (Paris, mars 1987).

M^{lle} C. ANDRÉ a été invitée à donner une conférence intitulée : *Immunocytochemical and pharmacological analysis of muscarinic acetylcholine receptors in cultured fibroblasts and mouse brain neurons*, au Colloque « Purification, Biosynthèse, Régulation des Récepteurs Membranaires », qui a eu lieu à Cap d'Agde (septembre 1986).

M. B. CROIZAT a donné une conférence sur l'*Evolution des marqueurs cytosquelettiques et mitochondriaux*, à l'Albert Einstein College of Medicine, New York (U.S.A.) (avril 1986).

M. Ph. DENOULET a été invité à donner sept conférences : 1) *Genetic expression of neurospecific isotubulins and its control during neuronal differentiation in mouse* et 2) *Functional approach of tubulin polymorphism in nervous system : studies on the axonal transport of the diverse isotubulins*, dans le Laboratoire de Génétique Moléculaire de l'Institut Gulbenkian de Sciences, à Oeiras, Portugal (octobre 1986) ; 3) *Expression des isotubulines au cours de la neurogenèse*, dans l'U 282, C.H.U. Henri Mondor, Créteil (janvier 1987) ; 4) *Contrôle de l'expression des isotubulines pendant la neurogenèse chez la souris*, dans le Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand (janvier 1987) ; 5) *Polymorphisme tubuline et neurogenèse*, dans le Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire et Cellulaire, Gif-sur-Yvette (février 1987) ; 6) *Le neuro-cytosquelette : les marqueurs tubulines dans la différenciation neuronale et leur rôle dans le transport axonal*, dans le cadre des Conférences Associées au D.E.A. de Biochimie de Paris VI (mai 1987) ; 7) *Expression et utilisation des isotubulines neurospécifiques chez la souris au cours de la neurogenèse*, dans le cadre de la Réunion Annuelle du Club Français du Cytosquelette, Banyuls (juin 1987). MM. Ph. DENOULET et B. EDDÉ ont présenté deux communications au First International Symposium on the Cytoskeleton in Cell Differentiation and Development, à Granada, Espagne (avril 1987) : a) *Neurospecific β -tubulin mRNA expression in the developing mouse brain* (Ph. DENOULET, B. EDDÉ, A. WOLFF et F. GROS) ; b) *Specific isotubulins expressed during long-term cultures of mouse brain neurons are controlled at both transcriptional and post-translational levels* (B. EDDÉ, Ph. DENOULET, B. DE NÉCHAUD, A. KOULAKOFF, Y. BERWALD-NETTER et F. GROS).

M^{me} M.M. PORTIER a été invitée au Symposium : « Peripheral Neuropathies » (Lisbonne, 14-16 novembre 1986) pour y présenter une communication intitulée : *Peripherin, an intermediate filament protein specific to the neurons of the peripheral nervous system*. Elle a participé à un enseignement sur les « Techniques d'Etude des Protéines » (Formation Continue) (Paris VII, 3-13 novembre 1986). Elle a donné un cours dans le cadre du D.E.A. de Neurosciences, à l'Hôpital de la Salpêtrière (22 janvier 1987), sur le thème « Cytosquelette normal et pathologique ». Elle a présidé une séance au Club de Recherche sur les Démences Séniles : « Cytosquelette et Démence Sénile » (15 mai 1987).

M. J. THIBAUT a participé au 2nd International Basal Ganglia Society Symposium, à Victoria, British Columbia (juillet 1986) ; un « poster » y a été présenté : *Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on basal ganglia functions* (D. DOUDET, M. ARLUISON, C. GROSS, P. WORMS, J. THIBAUT et B. BLOULAC). Au 10th European Neuroscience Association

Meeting, à Marseille (septembre 1986), un « poster » a été affiché : *Relationship between TH-, SP- and NPY-like immunopositive neuronal systems in the newt brain* (M.F. FRANZONI, A. FASOLO, G. PELLETIER, I. PERROTEAU, H. VAUDRY, et J. THIBAUT). A Jérusalem (avril 1987), à l'International Conference on New Directions in Affective Disorders, un « poster » a été présenté : *Monoamine oxidase : sites of action in the human brain* (C. KONRADI, P. RIEDERER, M. DIETL, R. DENNEY, J. THIBAUT, T. NAGATSU et K. JELLINGER). A Paris (mai 1987), à l'occasion de la Réunion Annuelle des Physiologistes, un « poster » a été présenté : « *Identification des neurones catécholaminergiques dans le cerveau du Téléostéen Gnathonemus petersii* » (T. SZABO, M. ARLUISON J. THIBAUT et M. RAVAILLÉ-VÉRON).

M^{mes} A. OLOMUCKI, C. DUBORD, E. DESBRUYÈRES et M. D.B. PHO ont participé au 15th European Congress on « Muscle and Motility », à La Grande Motte (septembre 1986).

M. M. OLOMUCKI a présenté une communication : *Reactions on unsaturated phosphoric acids with 2-aminopyridine* (avec J. Skolimowski et R. Skowronski) à la « 10th International Conference on Phosphorus Chemistry », à Bonn, R.F.A. (septembre 1986). Il a participé à la « VIIth International Round Table : Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications », à Konstanz, R.F.A. (octobre 1986), et à la « 17^e Réunion du Groupe d'Etudes Structure-Activité », à Touques, Calvados (mai 1987). Sur invitation de la Société Française de Chimie il a donné une conférence intitulée : *Réaction des bases des acides nucléiques avec les esters α -acétyléniques ; études chimiques et applications biologiques*, à Lille (mai 1987).

DISTINCTION

Le prix Dupont de Nemours a été décerné à l'Unité de Biochimie de l'Institut Pasteur (années 1986 et 1987) pour les travaux que dirige le professeur François GROS sur la différenciation musculaire.