

## Biochimie cellulaire

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

### *Données récentes sur la biologie du développement musculaire*

La biologie moléculaire du muscle et l'étude de sa différenciation connaissent un nouvel essor. Cette situation est liée d'une part aux progrès importants qui ont été accomplis dans l'analyse des mécanismes de la régulation génétique pendant la myogenèse mais aussi, et d'autre part, aux percées récemment réalisées en pathologie moléculaire (clonage du gène DMD et identification de la dystrophine). Dans ce cours, nous avons mis l'accent sur les mécanismes régulateurs intervenant aux niveaux génétique et épigénétique pendant les diverses étapes de la différenciation du muscle du système squelettique.

### *Détermination*

Après un bref rappel des données embryologiques fondées sur des échanges hétérospécifiques de cellules somitiques qui établissent le caractère prédéterminé des somites mésodermiques dans la formation de la musculature squelettique, nous avons discuté des travaux récents établissant un parallèle entre le degré de méthylation de l'ADN et l'étape première de détermination myogénique (« commitment »). La percée principale émane des observations anciennes de Constantinides, Taylor et Jones montrant que la lignée C3H/10T1/2/CL8 provenant d'embryon de souris peut être convertie à haute fréquence en myoblastes, adipocytes et chondrocytes après incorporation de 5-azacytidine.

Le mécanisme de « phénoconversion des cellules » de cette lignée, qui se comporte en tous points comme une population de cellules mésodermiques primitives, a fait l'objet d'intenses recherches quant aux mécanismes moléculaires impliqués. Ces recherches ont finalement débouché sur un résultat très important : le clonage (et le séquençage) de l'un des gènes intervenant dans la détermination des cellules précurseurs en myoblastes. Ce gène, baptisé Myo D-1, code pour une protéine comportant entre autres un domaine digité à Zn,

suivi d'un segment de 22 aminoacides présent dans le produit du gène c-myc et retrouvé dans deux protéines récemment impliquées dans la détermination neurogénique de la drosophile. Lorsque le cDNA de Myo D-1 est transfecté dans les cellules 10T1/2, il les convertit en myoblastes avec une fréquence élevée. Parmi les gènes-clés, dont l'azacytidine entraîne la déméthylation et l'activation, figurerait donc précisément le gène Myo D-1.

*Facteurs de trans-activation et séquences à effet régulateur « cis » dans l'expression du programme myogénique*

Les travaux initiés dans le groupe d'Helen Blau aux Etats-Unis ont montré que la synthèse des protéines spécifiques de muscle fait intervenir des facteurs protéiques capables d'agir en « trans » sur des éléments régulateurs pour activer les gènes correspondants (expériences sur des hétérocaryons). Par ailleurs, le laboratoire de Yaffé a été à l'origine des travaux visant à caractériser les séquences régulatrices cibles, présentes en amont des sites d'initiation, dans les régions promotrices des gènes d' $\alpha$ -actine squelettique.

Nous avons passé en revue les développements récents, dus pour une large part au groupe de L. Kedes, qui concernent la nature de certaines séquences régulatrices « amont », jouant un rôle-clé dans l'expression des gènes d'actine de muscle strié. Des boîtes de régulation, de séquence générale CC (séquence riche en AT) GG, baptisées « CARG boxes », jouent un rôle prédominant dans la trans-activation des gènes d'actine musculaire. Mais ces « CARG boxes » se retrouvent également en amont de gènes « non-musculaires » (c-fos,  $\beta$ -actine, récepteur de l'interleukine-2, etc.). Le caractère « tissu spécifique » de l'activation des gènes « musculaires » serait lié aux effets combinés de facteurs à caractère ubiquitaire (type SRF) et de facteurs à action spécifique du programme myogénique, ces deux types de facteurs se liant à des séquences CARG présentes en des régions régulatrices différentes. Il existe par ailleurs des mécanismes de régulation « compensée » tels que lorsque l'un des isogènes d'une famille multigénique est activé, un autre isogène apparenté voit son activité réduite, ou réciproquement. Cette situation a été particulièrement bien analysée dans le cas du couple des gènes d' $\alpha$ -actines ( $\alpha_{sk}$ ,  $\alpha_{card}$ ).

En ce qui concerne l'expression du programme myogénique à l'étape précédant la formation des myotubes, les travaux de Minty et Kedes suggèrent l'existence de deux catégories de facteurs : l'une d'elles comprendrait des éléments « d'activation » modifiant l'état conformationnel de la chromatine ; l'autre correspondrait aux facteurs dits de modulation, agissant en « trans » sur les séquences régulatrices « amont » ou les « enhanceurs ». L'hypothèse d'un contrôle génétique à deux niveaux intervenant de façon successive trouve un support dans des expériences comparant l'expression d'un gène donné ( $\alpha$ -actine<sub>card</sub>) à l'état transfecté et à l'état endogène, ainsi que dans l'étude d'une souche à programme myogénique inductible par l'IFG1.

### *Transitions isozymiques et régulations épigénétiques au cours de la maturation du muscle*

Une lente étape de maturation se produit après la formation des premiers myotubes conduisant à la formation d'une fibre musculaire adulte. Cette étape tardive du développement est caractérisée par l'établissement de synapses neuro-musculaires, ainsi que des changements dans la distribution des récepteurs cholinergiques qui se concentrent au niveau de la plaque motrice. On assiste également à une série de modifications dans la nature des isoformes contractiles exprimées. Notre laboratoire s'est particulièrement intéressé au programme d'expression des gènes codant pour les chaînes lourdes de myosine (MHC) dans les muscles à contraction « rapide » ou « lente ». Nous avons commenté ces travaux puisqu'ils illustrent notamment l'importance des contrôles épigénétiques (thyroxine, contrôle neuronal, etc.) sur la nature des isogènes MHC qui sont exprimés. Certaines des données obtenues en étudiant le développement des fibres musculaires sont d'ailleurs corroborées par des expériences portant sur la régénération du muscle faisant suite à sa lésion par la notoxine, ou sur le programme génétique de muscles adultes ayant subi une dénervation.

A noter que les stratégies mises en œuvre par la cellule musculaire pour assurer la régulation des gènes pendant l'acquisition du phénotype terminal accompagnant la maturation des fibres sont extrêmement diversifiées (coexpression-régression, épissage alternatif, activations en cascades dépendantes de facteurs épigénétiques ou non) alors même qu'il s'agit d'élaborer un assemblage supramoléculaire défini : le sarcomère. Il ne semble donc pas qu'une solution unique ait été adoptée au cours de l'évolution pour répondre aux exigences de temporalité et de morphopoïèse coordonnée.

### *Maladies neuromusculaires*

La dernière partie du cours a été consacrée aux caractéristiques du gène DMD récemment isolé dans l'équipe de Kunkel, ainsi qu'aux propriétés de la dystrophine, protéine codée par ce gène.

L'observation selon laquelle cette protéine représente un nouveau composant du cytosquelette musculaire, présent entre la couche interne du sarcolemme et l'appareil contractile, ouvre des perspectives très importantes à la compréhension du mécanisme biochimique responsable des altérations observées dans les muscles des myopathes atteints par la maladie dite de Duchenne, forme la plus sévère des affections neuromusculaires sévissant chez l'enfant.

F.G.

## SÉMINAIRES

*Les signaux génétiques au cours du développement normal et pathologique de la cellule musculaire*

K. SCHWARTZ (U 127 INSERM, Hôpital Lariboisière, Paris), *Conversions phénotypiques au cours de la croissance normale et pathologique des muscles striés adultes.*

M. BUCKINGHAM (Institut Pasteur, Paris), *L'expression des gènes d'actine et de myosine pendant la myogenèse chez la souris.*

M. FIZMANN (Institut Pasteur, Paris), *Régulation au cours de la myogenèse de l'expression des gènes codant pour diverses formes isomorphes de la tropomyosine.*

R. WHALEN (Institut Pasteur, Paris), *Les isoformes de la myosine et le contrôle de leur expression par les facteurs neuronaux et hormonaux.*

M. FARDEAU (INSERM U 153 et CNRS UA 614), *Anomalies de la myogenèse dans les affections neuro-musculaires humaines d'origine génétique.*

## ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

*BIOCHIMIE CELLULAIRE**L'hétérogénéité pharmacologique des récepteurs muscariniques : analyse du rôle des interactions cellulaires*

(C. ANDRÉ, G. DOS SANTOS, A. KOULAKOFF et Y. BERWALD-NETTER)

Les récepteurs muscariniques (mAChRs) sont les récepteurs cholinergiques prépondérants du système nerveux central, où ils sous-tendent des réponses excitatrices et inhibitrices des neurones impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques et cognitives. Les mAChRs sont hétérogènes sur le plan pharmacologique, fonctionnel et génétique comme cela a été démontré, respectivement, par des essais de liaison des agonistes et antagonistes spécifiques, par l'activation ou l'inhibition des différents transducteurs intracellulaires ou des canaux ioniques et, plus récemment, par la mise en évidence de l'existence de quatre gènes distincts codant pour les mAChRs.

Dans le cerveau adulte, la densité et l'abondance relative des différentes sous-classes de mAChRs varient selon l'aire cérébrale. Il a été suggéré que

l'expression différentielle des mAChRs serait régie par des signaux impliquant des interactions cellulaires, avec la mise en jeu de contacts directs (synaptiques ou autres), ou de facteurs solubles.

Avec l'objectif de confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons entrepris l'étude de l'expression des mAChRs dans des cultures de neurones dérivés du cerveau fœtal de la souris en les comparant avec le tissu cérébral. Précédemment, nous avons montré que les cultures des neurones dérivés du cerveau fœtal à 15 jours de gestation expriment des mAChRs dont les propriétés pharmacologiques et le profil d'accumulation sont très proches de ceux observés *in vivo*. Plus récemment, afin d'explorer l'importance de la communication entre les différentes régions du SNC sur le développement quantitatif et qualitatif des mAChRs, nous avons étendu cette étude à l'analyse des récepteurs dans des cultures de neurones provenant d'aires cérébrales choisies.

### 1. Analyse quantitative

Des mesures de liaison à l'équilibre de  $^3\text{H-N-méthyl-scopolamine}$  (NMS, antagoniste muscarinique), pratiquées sur des cultures de neurones dérivés des hémisphères cérébraux, du mésencéphale et du medulla-pons, ont montré que ces neurones synthétisent des récepteurs muscariniques dont l'affinité pour le  $^3\text{H-NMS}$  est identique à celle obtenue pour les récepteurs cérébraux. Dans les trois cas étudiés, les profils d'accumulation des mAChRs sont semblables sur le plan cinétique et quantitatif, et comparables à celui observé pour les cultures de neurones de cerveau total. Ces résultats contrastent avec le développement des mAChRs *in vivo*, où la teneur en mAChRs varie selon l'aire cérébrale : les valeurs de densité les plus élevées sont observées dans les hémisphères cérébraux et l'hippocampe, les plus basses dans le cervelet, celles du mésencéphale et du medulla-pons étant intermédiaires.

### 2. Analyse qualitative

La complexité pharmacologique des mAChRs a été explorée par des expériences de déplacement du  $^3\text{H-NMS}$ , ligand muscarinique global, avec deux ligands muscariniques sélectifs : l'acétylcholine (agoniste) et la pirenzépine (antagoniste). Chacun de ces ligands permet de distinguer des sous-populations de mAChRs qui diffèrent par leur affinité, ce qui est à la base de la classification pharmacologique des mAChRs. Les résultats obtenus mettent en évidence l'existence d'un ensemble hétérogène de sites de liaison muscarinique dans chacune des régions cérébrales étudiées. Ainsi, en culture comme *in vivo*, deux sous-classes principales de sites de liaison ont été révélées pour chacun des ligands sélectifs employés : en utilisant l'acétylcholine, on distingue des sites RH à haute affinité ( $K_{\text{Dapp}} = 10^{-7}$  M) et des sites RL à basse affinité ( $K_{\text{Dapp}} = 10^{-5}$  M) ; de même avec la pirenzépine, on détecte des sites

M1 à haute affinité ( $K_{Dapp} = 0,8-2,2 \times 10^{-8}$  M) et des sites M2 à basse affinité ( $K_{Dapp} = 2,3-4,4 \times 10^{-7}$  M). Ces valeurs d'affinité apparente ainsi que le rapport quantitatif des sites ont été déterminés par un traitement des données à l'aide d'un programme informatique approprié. Il a permis de déterminer que l'abondance relative des différents sites varie selon l'origine des cellules tout en restant semblable dans le tissu, *in situ* et en culture. Ainsi par exemple, dans les hémisphères cérébraux et les cultures qui en dérivent, les sites M1 représentent environ 40 % des sites totaux tandis que, dans les préparations provenant du mésencéphale et du medulla-pons, ce sont les sites M2 qui sont largement prédominants (> 85 %).

La conclusion de cette étude est que les cultures de neurones provenant d'aires cérébrales distinctes reproduisent fidèlement l'hétérogénéité pharmacologique des mAChRs de leurs homologues *in vivo*, à la fois sur le plan de leurs propriétés et de leur abondance relative. L'ensemble des résultats obtenus permet de penser que le phénotype pharmacologique des récepteurs muscariniques est une propriété intrinsèque des ensembles neuronaux d'une aire cérébrale donnée. Ce phénotype est déterminé à une phase précoce du développement ontogénique, il est conservé en culture et son maintien semble indépendant des interactions inter-régionales opérant dans le cerveau *in vivo*.

*Etude de la neurogenèse in vitro. Expression des oncogènes au cours de la neurogenèse. Régulations de l'expression génétique de la mitochondrie. Etude sur les benzodiazépines périphériques*

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

### 1. *Etude de la neurogenèse in vitro*

Nous avons mis au point un système de cultures primaires de neurones issus du cortex de fœtus de rat.

Nous poursuivons l'étude de l'expression génétique des protéines mitochondriales en utilisant des inhibiteurs spécifiques des synthèses mitochondriale (nonactine) et cytosolique (cycloheximide).

Les résultats préliminaires montrent une accumulation des marqueurs mitochondriaux accompagnant le développement spontané des cultures primaires. Grâce à l'immunocytochimie, nous suivons l'évolution des marqueurs initialement repérés sur gels bidimensionnels.

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

Le « screening » d'une banque de cDNA de souris néonatale et d'une banque de cDNA de cerveau de rat nous a fourni des sondes correspondant aux oncogènes c-myc, c-fos, et c-src.

On a sous-cloné ces différentes séquences dans le plasmide pBS afin d'obtenir des sondes RNA permettant des hybridations *in situ* et l'utilisation de RNA anti-sens dans les cultures cellulaires.

Ce matériel sera utilisé dans trois systèmes : 1) le cortex de souris prélevé à différents stades du développement, 2) les cultures primaires de neurones de rat, 3) le neuroblastome induit par le CCA ou d'autres agents.

### 3. Régulation de l'expression génétique de la mitochondrie

Nous analysons les interactions entre les génomes nucléaire et mitochondrial dans la synthèse des complexes protéiques mitochondriaux. Cette étude s'articule sur deux systèmes, le neuroblastome murin C 1300 et certains cas de myopathies mitochondriales.

La différenciation de type neuronal s'accompagne d'une accumulation des protéines mitochondriales et de changements au niveau des composants codés par les deux génomes.

Nous avons défini la pathologie moléculaire de certains cas de myopathies caractérisés par un déficit de la respiration mitochondriale.

Les altérations protéiques décrites concernent des composants codés par le DNA nucléaire ou mitochondrial. Nous avons pu identifier chez un patient une mutation ponctuelle du DNA mitochondrial qui se traduit par un ensemble de modulations affectant des protéines codées par les deux génomes.

### 4. Etude sur les benzodiazépines périphériques

L'existence de récepteurs des benzodiazépines périphériques est largement reconnue. Ces récepteurs sont localisés sur la membrane externe de la mitochondrie. En dépit de nombreux travaux, le rôle biologique de ces récepteurs demeure obscur.

Nous tentons une nouvelle approche des mécanismes mis en jeu par ces récepteurs en étudiant les effets des benzodiazépines périphériques sur le métabolisme mitochondrial. Nous utilisons des mitochondries extraites du cortex cervical de souris ainsi que des cellules entières de neuroblastome. Une première publication est soumise à Eur. J. Pharmacol.

### *Expression des isotubulines au cours de la neurogenèse*

(Ph. DENOULET, B. EDDÉ, B. DE NÉCHAUD, D. PINTO-HENRIQUE, 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 neuro-

spécifiques 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 analysé le polymorphisme tubuline au cours de la différenciation de neurones et de cellules gliales de cerveau de souris en culture primaire (en collaboration avec le groupe de Y. Berwald-Netter).

Dans les neurones qui se différencient *in vitro*, le polymorphisme tubuline augmente de manière tout à fait comparable à ce qui se passe *in vivo*. Par exemple, à trois semaines de culture, l'hétérogénéité des tubulines est identique à celle observée dans un cerveau de souris au 15<sup>e</sup> jour post-natal, âge théorique des neurones, et, après 1 mois de culture, pratiquement toutes les isotubulines du cerveau adulte sont représentées qualitativement. Les cellules gliales, quant à elles, n'expriment qu'un polymorphisme tubuline réduit ; cependant, une isotubuline, absente des neurones, est exprimée dans la glie.

La majorité des isotubulines exprimées dans le neurone sont dérivées de modifications post-traductionnelles. La phosphorylation de  $\beta'1$  en  $\beta'2$  ainsi que l'acétylation de diverses  $\alpha$ -tubulines ont été particulièrement étudiées. En ce qui concerne les  $\alpha$ -tubulines, plusieurs modifications post-traductionnelles, autres que l'acétylation, mais de nature encore inconnue, sont requises pour expliquer l'apparition des isoformes  $\alpha$  modifiées. La recherche de la nature chimique de ces modifications est en cours. Le jeu de ces diverses modifications pourrait ainsi moduler les propriétés structurales et fonctionnelles des tubulines et des microtubules dans le neurone, permettant d'assurer, par exemple, l'extension neuritique ou le transport axonal.

Sur un autre plan, nous avons cloné un grand nombre de cDNA  $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline à partir de banques cérébrales (embryonnaire, néo-natale et adulte). Leur caractérisation est en cours.

#### *Etude de l'expression génétique des isozymes de l'énolase durant la neurogenèse et la myogenèse*

(L. LEGAULT, avec N. LAMANDÉ, M. LAZAR, M. LUCAS et la collaboration du D<sup>r</sup> S. MAZO)

Un des événements marqueurs de la neurogenèse et de la myogenèse est la transition d'expression observée entre l'énolase embryonnaire  $\alpha\alpha$  et les éno-lases  $\gamma\gamma$  ou  $\beta\beta$  respectivement spécifiques des neurones et des fibres musculaires type II fonctionnels.

L'analyse des mécanismes génétiques et la recherche des facteurs épigénétiques impliqués dans l'expression distincte de chacun de ces gènes durant l'ontogenèse et au niveau cellulaire font l'objet de notre étude.

Une étape de cette étude impliquait la préparation de sondes ADN complémentaires correspondant à chacun de ces gènes. De telles sondes avaient été précédemment obtenues pour les émolases  $\alpha\alpha$  et  $\gamma\gamma$ . Nous avons donc poursuivi notre analyse et :

1) préparé des sondes ADN complémentaires correspondant à l'émolase  $\beta\beta$ . La séquence partielle de son ARN messenger a été établie, montrant que les séquences des régions codantes respectives des ARNs :  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  sont très voisines, et celles de leurs régions non codantes complètement hétérologues ;

2) établi que, durant la myogenèse, l'expression de l'émolase  $\beta\beta$  paraît contrôlée par la concentration des séquences de l'ARN correspondant et coïncide avec celle d'autres protéines marqueurs de la cellule musculaire différenciée ;

3) obtenu un premier ensemble de données suggérant l'existence d'un seul gène pour chacune des émolases  $\gamma\gamma$  et  $\beta\beta$  mais la présence probable de plusieurs gènes et/ou pseudogènes dans le cas de l'émolase  $\alpha\alpha$ .

L'étude de l'organisation et de la structure des gènes émolases et l'analyse fine de l'expression des transcripts correspondants au cours du développement se poursuivent.

*La périphérine, protéine de filament intermédiaire exprimée dans des populations neuronales définies*

(M.M. PORTIER, M. ESCURAT, F. LANDON, C. HUC et K. DJABALI)

1. *Expression de la périphérine*

L'ensemble des résultats obtenus par immunocytochimie (en collaboration avec M. Gumpel, Hôpital de la Salpêtrière, Paris) s'ajoutant à ceux de nos études biochimiques antérieures, peut se résumer ainsi :

a) la périphérine est le composant protéique majeur des filaments intermédiaires dans les neurones du système nerveux autonome ;

b) elle est bien exprimée dans le système nerveux sensoriel situé à l'extérieur du système nerveux central, c'est-à-dire dans les ganglions rachidiens, l'épithélium olfactif et la rétine ;

c) par immunocytochimie, on peut en déceler l'expression dans les neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière, ainsi que dans des régions de l'encéphale qui correspondent aux noyaux des nerfs crâniens.

Si la plupart de ces tissus sont originaires de la crête neurale (ganglions rachidiens et sympathiques, noyaux sensoriels de certains nerfs crâniens), il n'en est pas de même pour les neurones moteurs et la rétine, d'origine centrale, et l'épithélium olfactif d'origine placodale. On ne peut pas non plus

considérer l'expression de la périphérine comme restreinte aux neurones sympathiques et sensoriels au sens large (que ces derniers soient d'origine périphérique ou centrale) du fait de sa mise en évidence dans les neurones moteurs.

Deux hypothèses peuvent être envisagées actuellement :

1) la périphérine est exprimée dans les neurones dont les axones cheminent à l'extérieur du système nerveux central c'est-à-dire de l'axe encéphale - moelle épinière ; il s'agit des neurones sympathiques, des neurones sensoriels primaires et des neurones moteurs. La périphérine jouerait-elle un rôle dans la reconnaissance du trajet suivi par ces axones, par l'intermédiaire de protéines membranaires qu'il resterait à mettre en évidence ?

2) la périphérine serait exprimée, chez le rat, dans des parties du système nerveux qui, du point de vue de l'évolution, apparaissent comme archaïques par comparaison avec la partie du télencéphale à l'origine des hémisphères cérébraux. S'agirait-il d'une protéine « majeure » du système nerveux dans des espèces moins évoluées et dont l'expression tendrait à se raréfier au cours de l'évolution ?

## 2. *Etude de l'expression génétique*

Une préparation de cDNAs a été effectuée à partir des ARN messagers poly-A du neuroblastome de souris NIE 115 ; une banque a été ensuite réalisée dans le vecteur  $\lambda$  gt 11. Les clones qui expriment la périphérine ont été recherchés avec l'anticorps polyclonal utilisé pour l'étude de l'expression de la périphérine au cours du développement.

Cinquante six clones ont été ainsi obtenus ; nous venons de déterminer la séquence de trois d'entre eux (en collaboration avec Marguerite Lemonnier, Institut Pasteur). Les résultats obtenus permettent de conclure à l'existence de plusieurs ARN messagers, qui pourraient correspondre aux différentes isoformes de la périphérine.

## *Etude des enzymes de la voie de biosynthèse des catécholamines*

(E. BONNEFOY, G. BRUNEAU, F. COGÉ, A. HALTOUT, M. KRIEGER-POULLET, J. THIBAUT)

### 1. *Tyrosine hydroxylase (TH)*

L'étude de la TH a été poursuivie et nous nous sommes particulièrement intéressés à la susceptibilité de cette protéine aux enzymes protéolytiques. Grâce à une action ménagée de la trypsine, il a été possible d'obtenir des formes raccourcies de l'enzyme. Très curieusement, la trypsine crée séquen-

tiellement des formes plus actives de la TH, et la masse moléculaire du polypeptide passe de 62 kD à 56 kD. Nous avons pu démontrer que c'est l'extrémité N-terminale de la protéine qui joue ce rôle inhibiteur de l'activité. Un anticorps monoclonal obtenu précédemment s'est révélé être un outil capable de distinguer la tyrosine hydroxylase native de la tyrosine hydroxylase raccourcie dès les premières secondes de la protéolyse. Par l'utilisation de peptides synthétiques qui ont la même séquence que la tyrosine hydroxylase, nous avons entrepris de déterminer l'épitope minimum de cet anticorps.

## 2. DOPA-décarboxylase

Après avoir caractérisé la DOPA-décarboxylase néosynthétisée *in vitro* par traduction des ARN messagers de phéochromocytome de rat, nous avons entrepris la caractérisation de son ARN messager. Nous sommes en présence de deux ARN de taille voisine. Nous avons entrepris de cloner leur cDNA à partir d'ARNm de phéochromocytome. Nous disposons pour le clonage d'éléments de structure primaire de la protéine que nous avons purifiée. Cette séquence nous a permis de faire fabriquer des sondes oligonucléotidiques permettant un clonage dans un phage  $\lambda$  gt 10. En un deuxième temps, nous envisageons de cloner le cDNA dans un  $\lambda$  gt 11 en utilisant l'anticorps spécifique que nous avons préparé.

## CHIMIE BIOORGANIQUE

L'équipe de M. OLOMUCKI a poursuivi l'étude de la modification chimique des bases des acides nucléiques.

### 1. Réactions avec les esters $\alpha$ -acétyléniques

L'action de l'ester chlorotétrolique,  $\text{ClCH}_2\text{-C}\equiv\text{C-COOR}$ , transforme les nucléobases A et C dans les mono- et polynucléotides en dérivés comportant un substituant chlorométhyle. Les propriétés alkylantes de ce groupement ont été exploitées de deux manières.

#### a) Pontage acide nucléique - protéine

(F. THOMÉ, C. DUBORD, P. ROQUES et A. OLOMUCKI)

Appliquée aux tRNA<sup>Phe</sup>, notre méthode de dérivation affecte le bout CCA 3'-terminal du bras aminoacyle et la boucle de l'anticodon. Le tRNA ainsi modifié est susceptible d'établir des liens covalents avec la phénylalanyl-tRNA synthétase, révélant les sites de l'enzyme impliqués dans cette interaction. En effet, à pH 9 la synthétase est inactivée irréversiblement par le tRNA modifié. Le tRNA natif protège fortement l'enzyme contre l'inactivation.

Dans le tétramère  $\alpha_2 \beta_2$  constituant la synthétase, apparemment les deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  fixent le tRNA de façon covalente, alors que les travaux antérieurs n'avaient mis en évidence que l'interaction du tRNA<sup>Phe</sup> avec la sous-unité  $\beta$ .

b) *Attachement de fragments moléculaires fonctionnels à des oligonucléotides anti-sens*

(P. ROQUES, J.Y. LE GALL et G. STOJKOSKA)

Nous cherchons à mettre au point un système d'oligonucléotides anti-sens portant à une extrémité un nucléotide modifié permettant d'établir un lien covalent avec la séquence virale complémentaire visée. Un polynucléotide de ce type, contenant à l'extrémité 5' un résidu A modifié, a déjà été obtenu. Le groupement chlorométhyle de cet oligonucléotide est vraisemblablement trop court pour réagir directement avec la séquence complémentaire, mais peut par contre être utilisé pour y attacher une chaîne moléculaire portant un fragment réactif. Différents essais sont en cours pour réaliser cet objectif, en particulier ceux permettant de fixer sur l'oligonucléotide un intercalant alkylant, agissant après formation du duplex avec la séquence-cible.

## 2. Réactions avec les acides phosphoniques insaturés

(en collaboration avec R. SKOWRONSKI et J. SKOLIMOWSKI, Université de Lodz, Pologne)

Une possibilité de réaction des nucléobases avec des dérivés des acides phosphoniques insaturés,  $\text{CH}_2=\text{C}=\text{CH}-\text{P}(\text{O})\text{RR}'$ , a été étudiée sur l'exemple de l'amino-2 pyridine prise comme modèle. Des termes dans lesquels  $\text{R} = \text{Cl}$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{NMe}_2$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5$  et  $\text{R}' = \text{Cl}$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{H}$ ,  $\text{NMe}_2$  ont été préparés à partir de l'alcool propargylique. La réaction des acides chlorophosphoniques avec l'amino-2 pyridine conduit à des phosphoramidates qui subissent ensuite une cyclisation par addition de l'azote du cycle sur la liaison insaturée. Dans le cas où  $\text{R} = \text{R}' = \text{NMe}_2$ , le groupement  $\text{NH}_2$  de l'amino-2 pyridine s'additionne d'abord sur le système allénique pour donner une énamine, qui se cyclise dans une deuxième étape. Comme dans la réaction avec les esters  $\alpha$ -acétyléniques, un nouveau cycle est ainsi ajouté à la base d'origine ; dans le cas présent il s'agit d'un hétérocycle comportant l'azote et le phosphore. On envisage actuellement d'étendre cette méthode à la modification chimique des nucléobases.

## PUBLICATIONS

J.E. CELIS, P. MADSEN, J. ANDERSEN, P. ANDERSEN, J.L. VAYSSIÈRE, B. CROIZAT, H. THIessen et S. NIELSEN, *Antimitochondrial proteins antibo-*

*dies in a serum from a patient with systemic Lupus erythematosus : specificity and comparison with other antimitochondrial antibodies (Electrophoresis, 8, 238-243, 1987).*

Ph. DENOULET, B. EDDÉ, A. KOULAKOFF, Y. NETTER et F. GROS, *Isotubulin expression during mouse neuronal differentiation* (in : *The Cytoskeleton in Cell Differentiation and Development*, ICSU Symposium series, 8, 221-222, IRL Press, Oxford, Washington, 1987).

G. FILLIATREAU, Ph. DENOULET, B. DE NÉCHAUD et L. DI GIAMBERARDINO, *Stable and metastable cytoskeletal polymers carried by slow axonal transport* (*J. Neurosci.*, 8, 2227-2233, 1988).

K. DOMANSKA-JANIK, B. GAJKOWSKA, B. DE NÉCHAUD et J.M. BOURRE, *Myelin composition and activities of CNPase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in hypomyelinated « pt » mutant rabbit* (*J. Neurochem.* 50, 122-130, 1988).

I. BARAHONA, H. SOARÈS, L. CYRNE, D. PENQUE, Ph. DENOULET et C. RODRIGUES-POUSADA, *Sequence of one  $\alpha$ - and two  $\beta$ -tubulin genes of Tetrahymena pyriformis : structural and functional relationships with other eukaryotic tubulin genes* (*J. Mol. Biol.*, 202, 365-382, 1988).

Ph. DENOULET, B. EDDÉ, D. PINTO-HENRIQUE, A. KOULAKOFF, Y. BERWALD-NETTER et F. GROS, *The increase of tubulin heterogeneity during differentiation of neurons in primary culture is controlled mainly at the post-translational level* (in : *Structure and Functions of the Cytoskeleton*, sous presse, 1988).

B. EDDÉ, S. VANDAELE, M. DARMON et P. SOUBIRAN, *Human serum reacting specifically with a subset of  $\beta$ -tubulin isoforms* (*Biol. Cell*, 62, 157-163, 1988).

C.J. DECHESNE, P. ESCUDERO, N. LAMANDÉ, M. THOMANET et A. SANS, *Immunohistochemical identification of neuron-specific enolase and calbindin in the vestibular receptors of human fetuses* (*Acta Otolaryngol.*, 436, 69-75, 1987).

M. LUCAS, N. LAMANDÉ, M. LAZAR, F. GROS et L. LEGAULT-DÉMARE, *Developmental expression of alpha- and gamma- enolase subunits and mRNA sequences in the mouse brain* (*Dev. Neurosci.*, sous presse, 1988).

E. HIRSCH, M. RUBERG, M.M. PORTIER, M. DARDENNE et Y. AGID, *Characterization of two antigens in Parkinsonian Lewy bodies* (*Brain Res.* 441, 139-144, 1988).

M. ESCURAT, M. GUMPPEL, F. LACHAPPELLE, F. GROS et M.M. PORTIER, *Expression comparée de deux protéines de filaments intermédiaires, la périphérine et la protéine de neurofilament 68 kDa, au cours du développement embryonnaire du rat* (*Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, 306, Sér. III, 447-456, 1988).

A. LOMRI, P.J. MARIE, M. ESCURAT, M.M. PORTIER, *Cytoskeletal protein synthesis and organization in cultured mouse osteoblastic cells (FEBS Lett., 222, 311-316, 1987).*

M. DERER, O. GRYSZPAN-WINOGRAD et J. THIBAUT, *Croissance des prolongements de type neuritique des cellules chromaffines dans des cultures de médullo-surrénale de souris adulte. Influence des cellules non chromaffines (Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 305, Sér. III, 363-368, 1987).*

Y. TILLET et J. THIBAUT, *Early ontogeny of catecholaminergic structures in the sheep brain. Immunohistochemical study (Anat. Embryol., 177, 173-181, 1987).*

C.R. GERFEN, M. HERKENHAM et J. THIBAUT, *The neostriatal mosaic : II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems (J. Neurosci. 7, 3915-3934, 1987).*

C.R. GERFEN, K.G. BAIMBRIDGE et J. THIBAUT, *The neostriatal mosaic : III. Biochemical and developmental dissociation of patch-matrix mesostriatal systems (J. Neurosci. 7, 3935-3944, 1987).*

S.C. LANDIS, P.C. JACKSON, J.R. FREDIEU et J. THIBAUT, *Catecholaminergic properties of cholinergic neurons and synapses in adult rat ciliary ganglion (J. Neurosci., 7, 3574-3587, 1987).*

F. THOMÉ, P. VACHETTE, C. DUBORD et A. OLOMUCKI, *Conformational changes in octopine dehydrogenase induced by the binding of ligands (Biochim. Biophys. Acta, 915, 342-345, 1987).*

M. OLOMUCKI et J.Y. LE GALL, *Alkoxy-carbonylation of propargyl chloride : methyl 4-chloro-2-butynoate (Organic Syntheses, 65, 47-51, 1987).*

P. ROQUES et M. OLOMUCKI, *Reactions of nucleic acid bases with  $\alpha$ -acetylenic esters. III. Chemical modification of poly (A) and poly (C) (Eur. J. Biochem. 167, 103-109, 1987).*

#### DIPLÔME D'ÉTUDES APPROFONDIES

M<sup>mc</sup> E. BONNEFOY, *La tyrosine hydroxylase de phéochromocytome de rat : rôle de l'extrémité N-terminale de la molécule dans la régulation de son activité enzymatique, et phosphorylation de l'enzyme (Université Paris VI, septembre 1987).*

#### CONFÉRENCES. INVITATIONS. PARTICIPATIONS A DES CONGRÈS

Le Professeur F. GROS a donné deux séminaires en juin 1987 : 1) *Régulation au cours de la différenciation du muscle*, dans le laboratoire du Professeur

P. Chambon, à Strasbourg ; 2) *Aspects moléculaires de la neurogenèse*, dans le laboratoire du Prof. Labouesse, à Bordeaux. Il a présenté trois communications : l'une au XII<sup>e</sup> Congrès Brésilien de Biophysique, à Rio de Janeiro, Brésil (juillet 1987), intitulée : *Cytoskeleton and neuronal differentiation* ; l'autre au Joint Meeting of the « European Club for Muscle and Motility » and the « European Cytoskeletal Club », à Tiberias, Israël (août-septembre 1987), intitulée : *Molecular aspects of cytoskeleton formation during neurogenesis* ; la troisième à la 9<sup>e</sup> Conférence Internationale sur « La Nouvelle Génétique et la Carte des Gènes de l'Homme », à Paris (octobre 1987), sur le thème : *Phylogénèse et polymorphisme des gènes des protéines contractiles*. Il a visité le Laboratoire de Biologie Marine, à Concarneau en septembre 1987. Il a présenté une communication à l'U.N.E.S.C.O., à Paris (octobre 1987) sur *Les progrès de la biologie contemporaine*. A la Réunion « Université et Entreprise », à Paris (octobre 1987), il a donné une conférence sur *La biotechnologie en France et dans les pays avancés*. A l'occasion de l'inauguration du nouvel Institut des Biotechnologies de Porto, Portugal (octobre 1987), il a prononcé une conférence : *Les biotechnologies : un nouveau défi culturel*. Il a donné une autre conférence sur *Les secrets du gène* au Cercle Parisien (octobre 1987), et une troisième : *Génétique. Reproduction et maladies héréditaires*, dans le cadre des manifestations du centenaire de l'Institut Pasteur, à Paris (novembre 1987). Au Colloque « Molecular Design and Engineering of Proteins Applied to Catalysis and Localization », A.F.I.R.S.T., Kiryat Anavim, Israël (novembre 1987), il a présenté une communication intitulée : *Genetic polymorphism in eukaryotic systems*. Il a co-organisé un Colloque, patronné par la C.E.E., à l'Institut Pasteur, où il a présenté une communication : *Dynamique moléculaire et cellulaire de la biocommunication* (décembre 1987). Il a participé à la Réunion « Human Frontier Science Programme », à Tokyo, Japon (décembre 1987).

M<sup>lle</sup> C. ANDRÉ a participé au 7th Meeting of the European Society for Neurochemistry, à Göteborg, Suède (juin 1988), où elle a présenté une communication : *Development and pharmacological properties of muscarinic acetylcholine receptors in cultures of mouse brain neurons*.

M<sup>me</sup> A. KOULAKOFF a donné une conférence sur le *Développement des récepteurs aux neurotoxines*, dans le cadre du D.E.A. de Physiologie du Développement, Université Paris VI (janvier 1988). Elle a également participé au 7th Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, à Jérusalem (juin 1988), où elle a présenté une communication : *Multiple forms of synapsin-I in mouse brain tissue and neuronal cultures*.

M<sup>me</sup> Y. BERWALD-NETTER a organisé, avec le professeur F. GROS et le professeur U.Z. LITTAUER (Rehovot, Israël), le 1<sup>er</sup> Colloque Euro-Israélien de Neurosciences, qui a eu lieu aux Arcs (Savoie) en avril 1988 ; elle y a présenté une conférence intitulée : *Voltage-gated sodium channels and muscarinic receptors : expression in CNS cells in vivo and in culture*. Elle a également

été invitée à présenter deux conférences : 1) *Molecular and pharmacological differences in the properties of voltage-gated Na-channels in neurons and astroglia*, dans le cadre d'un « Workshop on Functional Consequences of Demyelination », à La Sapinière, Québec (juin 1988) ; 2) *Sodium and potassium channels of mammalian astroglia*, au 7th Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, à Jérusalem (juin 1988).

M. J.L. VAYSSIÈRE a été invité à donner quatre conférences : 1) *Etude de la biogenèse mitochondriale sur des modèles cellulaires in vitro*, à l'Unité I.N.S.E.R.M. 153, Paris (septembre 1987) ; 2) *Molecular characterization of a fatal infantile myopathy with cytochrome c oxidase deficit*, au Fachbereich Chemie, Philipps Universität, Marburg, R.F.A. (décembre 1987) ; 3) *Régulation de l'expression des protéines mitochondriales dans la neurogenèse et dans les myopathies*, dans le cadre du D.E.A. de Physiologie du Développement, Université Paris VII (janvier 1988) ; 4) *Analyse moléculaire d'un déficit de la cytochrome c oxydase associé à une myopathie fatale infantile*, à l'Unité I.N.S.E.R.M. 12, Paris (mars 1988).

MM. J.L. VAYSSIÈRE et B. CROIZAT ont participé au 2<sup>nd</sup> Congress of the International Society for Myochemistry, à Rome (octobre 1987) où ils ont présenté deux communications : 1) *The expression of muscle mitochondrial proteins* ; 2) *Analysis of muscle proteins in two patients with cytochrome c oxidase deficiency*.

M. Ph. DENOULET a été invité à donner trois conférences : 1) *Isotubulines et différenciation neuronale*, au Centre de Recherches du C.N.R.S. d'Ivry (décembre 1987) ; 2) *Neurotubulines : expression au cours de la différenciation, et fonctions moléculaires dans le transport axonal*, dans le cadre des Conférences Associées au D.E.A. de Biochimie, Paris VI (février 1988). 3) *Isotubulin expression during neuronal cell differentiation in the mouse*, dans le cadre du 4th European Symposium on « The Structure and Functions of the Cytoskeleton », Lyon (avril 1988).

M<sup>me</sup> A. WOLFF a participé au « Meeting on Cellular Dynamics » qui s'est tenu à Tibériade (Israël) en septembre 1987 ; elle y a présenté un « poster » : *Production and characterization of monoclonal antibodies against tubulin* (A. WOLFF, B. de NÉCHAUD, D. CHILLET et F. GROS). Elle a été invitée à donner une conférence : *Approche du polymorphisme des tubulines par l'utilisation d'anticorps monoclonaux : anticorps induits et anticorps naturels*, au Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, Orsay (avril 1988).

M. B. EDDÉ a participé au 4th European Symposium on « The Structure and Functions of the Cytoskeleton », Lyon (avril 1988), où il a présenté un « poster » :  *$\alpha$ -tubulin acetylation in cultured neuron and glia* (B. EDDÉ, Ph. DENOULET, A. KOULAKOFF, Y. BERWALD-NETTER et F. GROS).

M. N. LAMANDÉ a assuré un mois d'enseignement dans le domaine de la Biologie Moléculaire à l'Institut de Biophysique Carlos Chagas, Université Fédérale de Rio de Janeiro, Brésil (15 avril-22 mai 1988).

M<sup>me</sup> M.M. PORTIER a été invitée à présenter des communications : 1) au Symposium Européen sur « La Structure et la Fonction du Cytosquelette » (Lyon, avril 1988) : *Peripherin, an intermediate filament protein, is a developmental marker of specific neuronal populations* ; 2) au Symposium intitulé « Molecular and Clinical Aspects of Developing Neural Systems » (Jerusalem, juin 1988) : *Expression of peripherin, an intermediate filament protein in sensory neuron*. Elle y a présenté également un « poster » : *Comparative study of the expression of two intermediate filament proteins : peripherin and the 68 kDa neurofilament protein, during the development of the rat embryo*. 3) au Club des Neuropathologies (Angers, juin 1988) : *La périphérine, protéine de filament intermédiaire, marqueur de différenciation neuronale*. Elle a aussi participé à un enseignement sur les « Techniques d'Etude des Protéines » (Formation Continue, Université Paris VII, octobre 1987).

M. M. ESCURAT a présenté un « poster » au Symposium Européen sur la « Structure et les Fonctions du Cytosquelette » (Lyon, avril 1988) : *Expression of the 68 kDa neurofilament protein and of peripherin, another intermediate filament protein, during the development of the rat embryo*.

M<sup>me</sup> C. HUC a présenté un « poster » au Symposium Européen sur la « Structure et les Fonctions du Cytosquelette » (Lyon, avril 1988) : *Phosphorylation of peripherin, an intermediate filament protein, in mouse neuroblastoma NIE 115 cell line*.

M<sup>me</sup> F. LANDON a présenté un « poster » au Symposium Européen sur la « Structure et les Fonctions du Cytosquelette » (Lyon, avril 1988) : *Cloning of a cDNA encoding peripherin, an intermediate filament protein specific to the peripheral nervous system*.

M<sup>me</sup> M. KRIEGER-POULLET et M. F. COGÉ ont participé à la réunion spécialisée de l'Association des Physiologistes « Neurosciences », à Marseille (mars 1988). Ils y ont présenté un « poster » : *Ontogenèse précoce des neurones sérotoninergiques dans l'encéphale du fœtus ovin. Etude immunohistochimique à l'aide d'anticorps anti-5 HT et anti-AADC* (Y. TILLET, M. KRIEGER-POULLET et F. COGÉ).

M. J. THIBAUT a participé à ce même congrès ; son « poster » avait pour titre : *Distribution comparative de divers marqueurs de la transmission dopaminergique dans le striatum de rat par immunohistochimie et radioautographie quantitative. Modifications consécutives à une lésion nigrostriée dopaminergique* (C. FEUERSTEIN, R. PERETTI-RENUCCI, M. SAVASTA, N. ZAIM-BENDAH-MANE, M. MANIER, N. MONS, M. GEFFARD et J. THIBAUT). Au 9th International Symposium on « Parkinson Disease », à Jérusalem (1988), il a présenté un « poster » : *Application of quantitative autoradiography and immunohistochemistry to the study of the striatal distribution of various dopaminergic and related markers in the rat* (C. FEUERSTEIN, R. PERETTI-RENUCCI, M. SAVASTA, N. ZAIM-BENDAH-MANE, M. MANIER, N. MONS, M. GEFFARD

et J. THIBAUT). A l'European Winter Conference on « Brain Research », à Val d'Isère (1988), il a présenté un « poster » : *Implication of striatal protein kinases in the regulation of tyrosine hydroxylase from dopaminergic terminals* (S. EL MESTIKAWY, J. THIBAUT et M. HAMON).

M. M. OLOMUCKI a participé au Colloque Européen « Origins and Early Evolution of Life » à Barcelone, Espagne (juillet 1987), où une communication par affiche a été présentée : *Reaction of nucleic acid bases with  $\alpha$ -acetylenic esters. Application to nucleosides, nucleotides and nucleic acids* (P. ROQUES, J.Y. LE GALL, F. THOMÉ, F. BLOIS, A. OLOMUCKI et M. OLOMUCKI). Il a donné une conférence intitulée : *A conformation-specific chemical modification of nucleic acids*, à « l'International Congress on Nucleic Acid Interactions », à Padoue, Italie (septembre 1987). Il a été invité à faire un séjour d'étude à l'Université de Lodz, Pologne, et à donner une conférence à la Société Chimique de Pologne : *Reactions of nucleic acid bases with  $\alpha$ -acetylenic esters : chemical aspects and biological applications* (octobre 1987).

M. P. ROQUES a présenté une communication orale : *Une méthode chimique d'évaluation de la conformation des acides nucléiques*, aux Journées de Chimie Organique de la Société Française de Chimie, à Palaiseau (septembre 1987). Il a participé à l'Atelier I.N.S.E.R.M. « Le point sur les anti-messagers ; des outils de génétique aux nouvelles familles de médicaments » (mars 1988).

#### DISTINCTIONS

Le prix Dupont de Nemours a été décerné pour la 3<sup>e</sup> année consécutive à l'Unité de Biochimie de l'Institut Pasteur pour les travaux que dirige le professeur François GROS sur la différenciation musculaire.