

## Biochimie Cellulaire

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

### *Cytosquelette et neurogénèse*

Parmi les constituants de la cellule qui sont aujourd'hui les mieux étudiés sous l'angle de la Biologie Moléculaire figurent à coup sûr les éléments du cytosquelette. On range sous cette dénomination trois grandes catégories de structures intracellulaires capables de s'organiser en réseaux auxquels on est à même d'assigner des fonctions définies. Il s'agit :

1) des *microfilaments* formés par l'assemblage de filaments d'actines cytoplasmiques dont le rôle dans la motilité cellulaire est bien connu. Ils interviennent également dans la formation des anneaux de constriction au cours de la cytokinèse.

2) des *microtubules* présents dans toutes les cellules encaryotiques, à la seule exception des cellules rouges anucléées, assemblages rigides formés par l'association de sous-unités : les *tubulines* mais auxquels sont associés, soit passagèrement, soit de façon permanente, toute une série de protéines : les MAP (« microtubules associated proteins ») et les TAU (« tubulin associated units »).

3) les *réseaux de filaments intermédiaires*, ainsi dénommés parce qu'ils présentent une section de dimension comprise entre celle des microfilaments (6 nm) et celle des microtubules (25 nm). La caractéristique majeure des filaments intermédiaires est la très grande diversité des sous-unités constitutives dont la nature chimique dépend étroitement du tissu. Microfilaments, microtubules et filaments intermédiaires forment souvent des réseaux de connexion et sont associés, par ailleurs, soit à la membrane plasmique, soit à la membrane nucléaire ainsi qu'à une multitude d'organites (mitochondries, vésicules synaptiques, etc.).

Dans le premier cours, nous avons passé en revue les principales données relatives à la physicochimie et à la biochimie des microtubules et des MAPs.

L'importance de ce réseau tient au rôle qu'il est appelé à jouer dans des processus cellulaires aussi variés que : la formation du fuseau achromatique au cours de la division, l'acquisition et le maintien de la polarité cellulaire, notamment dans les cellules neuronales, le mouvement des organelles, les processus de sécrétion, etc. Les tubulines constitutives, appelées  $\alpha$  et  $\beta$ , ont des PM voisins, mais elles sont cependant extrêmement polymorphes, étant les produits de déterminants apparentés formant des familles multigéniques. L'assemblage des tubulines pour constituer les structures cylindriques caractéristiques des MT est un processus dépendant du GTP ainsi que des ions  $Mg^{++}$  et que favorise la présence des MAPs. Après avoir passé en revue les modèles tridimensionnels rendant compte de l'arrangement des sous-unités (notamment le modèle de Klug et Amos, 1974), analysé les réactions d'interaction des tubulines avec les nucléotides à guanine ainsi que les mécanismes de nucléation au niveau des centres organisateurs, on s'est intéressé aux propriétés des MAPs : on connaît aujourd'hui un nombre élevé de ces protéines qui régissent la formation d'édifices microtubulaires distincts selon les tissus ou l'état de développement ; les MAPs, qui stabilisent les tubulines dans l'état polymérisé, se rangent aujourd'hui en 5 catégories distinctes ayant des PM compris entre 125 et 35 kilodaltons. Certaines ( $MAP_3$ ,  $MAP_4$ ) sont abondantes dans le cerveau. Quant aux facteurs Tau décrits en 1975 par Weingarten, ils sont de plus petit PM (55 à 68 kD), mais la liste des protéines susceptibles de former des associations transitoires avec les MT est impressionnante (calmodulines, ankyrines, chartines, synapsines, fodrines, etc.). Les MAPs se lient aux microtubules polymérisés par une région (ou domaine « a ») assez courte de la chaîne polypeptidique (35 à 40 kDa), le reste de la chaîne (domaine « b ») étant projeté vers l'extérieur perpendiculairement à l'axe central. Une kinase, AMP cyclique dépendante, est associée au domaine « b » et la calmoduline au domaine « a ». Map et Tau se lient à des domaines similaires des tubulines (portion C-terminale), les protéines Tau possédant un site de liaison additionnel localisé dans une région de la chaîne des tubulines voisine de l'extrémité N-terminale.

Les études des immunologistes et neurobiologistes indiquent que ces MAPs sont des marqueurs précieux dans l'étude de la neurogénèse.  $MAP_1$  est prépondérante dans les substances blanches et est localisée dans les neurones,  $MAP_1$ -A prédomine dans les dendrites et les corps cellulaires,  $MAP_1$ -B dans les axones.  $MAP_2$  est exclusivement décelée dans les dendrites (Matus) alors que Tau réside essentiellement dans les axones.  $MAP_3$  se localise dans les cellules gliales riches en neurofilaments, et  $MAP_4$  est spécifique des cellules gliales. Fait important, certaines de ces protéines ( $MAP_2$  notamment) établissent des connexions entre microtubules et neurofilaments.

La seconde partie du cours est consacrée à la Biologie Moléculaire des protéines de filaments intermédiaires.

Ceux-ci sont désormais rangés en 5 classes :

- 1) les kératines de type acide, présentes dans les épithéliums ; elles sont au nombre de quinze ;
- 2) les kératines neutres ou basiques ;
- 3) l'ensemble : vimentine (mésenchyme), desmine (muscle), protéine fibrillaire acide de la glie ou GFA (astrocytes et cellules gliales), périphérine (certains neurones) ;
- 4) les protéines de neurofilaments (ces derniers comprennent 3 sous-unités ; (NFL, 60 à 70 kDa ; NFM, 105 à 110 kDa et NFH, 135 à 150 kDa) ;
- 5) les lamines, protéines constitutives de la lame nucléaire (« nuclear lamina ») ou « karyosquelette », situées à la surface interne de la membrane nucléaire.

Toutes les protéines de filaments intermédiaires (IFP : « intermediate filament proteins ») présentent des arrangements moléculaires semblables avec :

- 1) un domaine hélicoïdal, comprenant 4 régions à séquences en heptades, favorisant des superenroulements,
- 2) des domaines terminaux, eux-mêmes décomposables en sous-domaines (« régions » homologues et « variables » et régions à acides animés basiques).

Ces protéines de filaments intermédiaires forment dans les cellules des assemblages oligomériques (arrangements antiparallèles à 4 chaînes). Par leur portion basique, aminotermine, les IF de classe III s'attachent à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une protéine spéciale, l'ankyrine (protéine d'ancrage). Par leur région C-terminale, elles se fixent à la membrane nucléaire, en s'attachant à la lamine B. Dans les réseaux de kératines, les arrangements sont différents.

Le second cours est consacré aux mouvements des organites à la surface des microtubules, mouvement catalysé par des protéines douées d'activités ATPasiques particulières : la *kinésine* (purifiée en 1985) qui assure la propagation des vésicules synaptiques dans une direction antérograde, et la *dynéine* (découverte en 1965), responsable des mouvements rétrogrades. De très gros progrès ont été réalisés non seulement dans l'analyse fine des mouvements vésiculaires (par exemple en utilisant des billes de latex imbibées de kinésine) à la surface de microtubules étalés sur des plaques siliconées, mais aussi dans la Biologie moléculaire de ces nouvelles ATPases, véritables « moteurs » intracellulaires qui amènent les vésicules à destination (terminaisons nerveuses, ou corps cellulaires).

Le troisième cours tente d'approfondir le déterminisme génétique du polymorphisme des tubulines : le nombre de tubulines est en général très élevé, ainsi que le révèle l'examen des profils électrophorétiques portant sur des préparations en provenance de divers tissus, mais c'est dans le cerveau que le

phénomène s'avère le plus prononcé : on ne décèle pas moins d'une vingtaine de bandes distinctes après fractionnement d'une préparation de tubulines totales, obtenue en isolant les microtubules à partir du tissu cérébral de souris prélevé à l'âge adulte. Le degré de complexité de ces ensembles dépend d'ailleurs du développement de l'animal.

Cette énorme diversité moléculaire relève en fait de deux causes : a) d'une part l'existence de familles multigéniques formées de déterminants codant pour des  $\alpha$ - et des  $\beta$ -tubulines respectivement. Certains gènes (ils sont au nombre de 5 à 6 pour chaque sous-unité) s'expriment préférentiellement ou exclusivement dans certains tissus (ex :  $\alpha 3$  et  $\alpha 7$  sont prépondérants dans le testicule,  $\alpha 1$  dans le muscle,  $\alpha 1$  prédomine dans le cerveau ; en ce qui concerne les  $\beta$ -tubulines,  $\beta 1$  abonde dans les globules rouges nucléés,  $\beta 2$ , 3, 4, 5 et  $\beta 6$  dans le cerveau, etc.), d'autres gènes ( $\alpha 6$  et  $\alpha 2$ ) étant exprimés de façon ubiquitaire. Des études comparatives ont également permis de regrouper ces diverses tubulines en fonction de leurs homologues de séquences (Cleveland). La « raison d'être » de ce polymorphisme est loin d'être établie. Pour certains, elle correspond à une spécialisation fonctionnelle étroite (ex :  $\beta 6$ , alias  $\beta'_2$  pour d'autres auteurs) est strictement neuronale et subit des phosphorylations au cours de la neurogénèse. Pour d'autres on est en présence d'une situation qui résulterait du jeu de l'évolution, toutes ces tubulines remplissant les mêmes fonctions.

b) D'autre part les produits résultant de l'expression de ces différents gènes subissent au cours du développement de nombreuses modifications post-traductionnelles (détyrosylations, acétylations, phosphorylations), ce qui accroît leur diversité.

Dans la dernière partie du cours on s'intéresse aux mécanismes qui contrôlent la *formation* de ces tubulines. Ceux-ci sont de deux types : activation privilégiée de certains gènes au cours de la différenciation ou processus d'auto-régulation opérant lors de la traduction.

En effet Cleveland et ses associés ont montré que la formation de la tubuline était en réalité régie par un mécanisme régulateur faisant intervenir la concentration relative en hétérodimères. Il s'agit essentiellement d'un mécanisme modulant la stabilité du messenger : les sous-unités  $\alpha$  ou  $\beta$ , ou encore l'hétérodimère se lient en effet à la chaîne polypeptidique en voie de formation sur le polysome, au niveau de la position N-terminale de cette chaîne. Ceci activerait une ribonucléase endogène présente dans le ribosome et provoquerait la coupure du messenger, interrompant ainsi la traduction.

Le 4<sup>e</sup> cours traite de l'organisation des gènes codant pour les protéines de filaments intermédiaires. Il ressort en particulier de ces études que les gènes des classes I à III (voir ci-dessus) sont organisés selon un même mode (un même « pattern ») avec 8 introns, en admettant toutefois certaines variantes

quant aux positions de ces introns. L'organisation des gènes des protéines IF de classe IV (neurofilaments) est très différente (3 introns au lieu de 8), ces introns occupant des positions distinctes de celles observées dans les gènes des classes I et III.

Ces considérations conduisent à proposer de très intéressants modèles rendant compte de l'évolution des gènes IF à partir d'un gène primordial commun, et une séquence d'événements provoquant l'effacement ou l'insertion de certains introns. La dernière partie de ce cours est consacrée aux modalités d'expression de ces gènes pendant le développement des tissus, celles-ci faisant intervenir des régulations de type transcriptionnel ou post-traductionnel. Récemment, d'intéressants travaux ont permis d'éclairer la régulation transcriptionnelle grâce à l'emploi du modèle des souris transgéniques (Julien et coll., 1987). Les auteurs ont localisé les portions du gène codant pour la chaîne légère des triplets des neurofilaments, en microinjectant des fragments de ce gène, recombinés à un marqueur de type CAT dans des ovocytes de souris fertilisés, et en réimplantant ces ovocytes chez des souris « porteuses ». Les transgénètes ainsi obtenus n'expriment le recombinant que dans le tissu nerveux (neurones et prolongements). Il semblerait donc que l'on ait ainsi mis la main sur des séquences régulatrices de type « enhancer » permettant l'expression sélective des gènes codant pour les protéines de neurofilaments. On devrait alors être en mesure de préciser, d'ici peu, les facteurs de régulation capables de moduler le fonctionnement d'un gène IF s'exprimant préférentiellement dans le système nerveux.

Le dernier cours est consacré à l'analyse détaillée d'une situation pathologique résultant d'un dysfonctionnement dans l'établissement des réseaux de cytosquelette au cours du vieillissement cérébral. La pathologie envisagée est celle qui correspond au syndrome d'Alzheimer, syndrome relativement fréquent chez les personnes au-delà de la soixantaine. On passe en revue les nombreux travaux consacrés à la genèse des dépôts amyloïdes, et surtout à la formation des pseudoinclusions baptisées câbles neurofibrillaires (NFT, ou « neurofibrillary tangles »). Des hypothèses intéressantes font jouer à des altérations des facteurs Tau (voir ci-dessus) un rôle de premier plan dans la formation de ces câbles dont l'accumulation altérerait les phénomènes de communication inter-neuronale.

F.G.

## SÉMINAIRES

*Cytosquelette : déterminisme génétique  
et dynamique de la croissance neuronale*

D. PAULIN (Institut Pasteur, Paris), *Les séquences régulatrices des gènes des filaments intermédiaires.*

Ph. DENOULET (Collège de France, Paris), *Le polymorphisme tubuline : expression au cours de la différenciation neuronale et rôle dans le transport axonal.*

B. EDDÉ (Collège de France, Paris), *Etude des modifications post-traductionnelles.*

M. BORNENS (C.N.R.S., Gif-sur-Yvette), *Cytosquelette et cycle cellulaire : la p34<sup>cdc2</sup> s'associe au centrosome en G2/Mitose et est séquestrée dans des vésicules en anaphase.*

M.M. PORTIER (Collège de France, Paris), *La périphérine, protéine de filament intermédiaire, marqueur de différenciation neuronale.*

## PROFESSEURS INVITÉS

Des personnalités étrangères, invitées par le Collège de France, sur invitation du Professeur Gros, ont donné des séries de conférences :

Le Professeur M. Arthur BANK (Université de Columbia de New York) : *The molecular regulation of human globin genes expression. Genes transfer : an approach to gene therapy for disorders of human haemoglobin.*

Le Professeur M. Benno MÜLLER-HILLER-HILL (Institut de Génétique de l'Université de Cologne) : *How lac repressor recognizes lac operator ? Is there a code for protein DNA-recognition ?*

D'autres professeurs ont donné un séminaire au laboratoire :

Le Docteur Lloyd A. GREENE (College of Physicians and Surgeons of Columbia University) : *Studies on the mechanism of action of nerve growth factor.*

Le Docteur R. LEDEEN (Institut für Physiologische Chemie, Cologne, R.F.A.) : *The role of gangliosides in neuronal differentiation.*

Le Docteur K. ANDERSSON (Laboratoire de Biochimie, Université de Bergen, Norvège) : *Régulation de l'activité de la tyrosine hydroxylase : Rôle des catéchols dans la rétroinhibition, influence de la phosphorylation.*

Le Docteur J. BONNET (Institut de Biochimie cellulaire et Neurochimie, C.N.R.S., Bordeaux) : *Etude de la myélinogenèse du système nerveux périphérique chez la souris normale et le mutant trembleur : Expression des protéines majeures et des ARN messagers correspondants.*

Le Docteur FUNG-CHOW ALEX CHIU, Ph. D. (Assistant Professor of Neurology and Neuroscience, Albert Einstein College of Medicine, New York) : *Characterization of a novel neurofilament protein.*

Le Docteur M. SHELANSKI (Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology, Department of Pathology, Columbia University, New York) : *Regulation of microtubule assembly in vivo and in vitro.*

#### ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

#### BIOCHIMIE CELLULAIRE

*La synaptogenèse dans les neurones en culture : étude à l'aide d'anticorps anti-synapsine*

(A. KOULAKOFF, Ph. DENOULET, Y. BERWALD-NETTER)

Nos travaux sur l'accumulation des canaux Na voltage-dépendants dans le cerveau *in vivo* et en culture ont suggéré que l'établissement des contacts synaptiques pourrait représenter une étape importante dans la régulation de l'expression de ces canaux. C'est pourquoi, à défaut de méthodes permettant de bloquer la formation des synapses, nous avons cherché à obtenir des renseignements sur la synaptogenèse dans notre système de neurones en culture, afin d'explorer sa relation temporelle avec l'accumulation des canaux Na voltage-dépendants. Pour cela notre choix a porté sur l'étude du développement des contacts synaptiques révélés à l'aide d'anticorps anti-synapsine.

La synapsine, identifiée et purifiée dans l'équipe du Prof. Greengard (Rockefeller University), est une phosphoprotéine du système nerveux associée sélectivement à la face externe (cytoplasmique) des petites vésicules synaptiques. Des données récentes indiquent que cette protéine serait impliquée dans la régulation de la mobilité des vésicules, requise pour les processus d'exocytose. Les travaux de P. de Camilli sur la distribution de la synapsine dans des coupes de tissu cérébral ont clairement établi que l'accumulation de la synapsine est corrélée sur le plan temporel et topologique avec la formation des synapses et représente ainsi un indice de la synaptogenèse.

L'utilisation des anticorps anti-synapsine en immunocytochimie sur des cultures de neurones du cerveau fœtal de souris nous a permis de faire les

observations suivantes : (i) à des phases précoces de leur différenciation (3-4 jours *in vitro*), les neurones en culture ne présentent qu'un marquage faible et diffus au niveau du cytoplasme des somas neuronaux. (ii) Parallèlement à l'élaboration d'un réseau neuritique complexe, un marquage intense à distribution punctiforme devient proéminent au niveau des points de contact neurite-neurite et neurite-soma. (iii) La densité des « points » de concentration de la synapsine augmente avec le temps de manière bimodale et leur abondance dépend de la densité des cellules neuronales. (iv) Le profil temporel d'accumulation de la synapsine coïncide avec celui de l'accumulation des canaux Na voltage-dépendants. Ceci indique une corrélation, sinon une relation de cause à effet, dans le développement de deux fonctions fondamentales des neurones : la transmission synaptique d'une part, et la genèse et la propagation du potentiel d'action d'autre part.

Comme un moyen d'analyse plus fine de la synapsine et éventuellement de sa quantification, une étude de la protéine solubilisée a été effectuée par électrophorèse en gel bidimensionnel. Cette approche a conduit à une observation inattendue - l'existence de plusieurs isoformes de la synapsine qui diffèrent par leur point isoélectrique et/ou leur poids moléculaire apparent. Au cours de la maturation des neurones *in vitro*, les différentes formes de la synapsine apparaissent séquentiellement. Par contre, *in vivo*, la complexité de la synapsine est décelable dans le cerveau même à des phases précoces de l'ontogenèse, et la maturation des neurones s'accompagne principalement d'une augmentation quantitative des différentes isoformes. Cette différence dans le profil d'évolution de la synapsine peut s'expliquer par l'asynchronie développementale des sous-populations neuronales *in vivo* qui contraste avec la maturation quasi synchrone des neurones en culture. Des essais d'incorporation de  $^{32}\text{P}$ i indiquent que la majorité sinon toutes les isoformes de la synapsine sont phosphorylées. Etant donné que la synapsine est phosphorylable sur des sites distincts par trois kinases (une kinase cAMP-dépendante et deux kinases  $\text{Ca}^{++}$ -calmoduline-dépendantes), il est vraisemblable que les différentes isoformes représentent des états de phosphorylation de la protéine.

*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-LOSSOUARN, G. BONNE et M. BASSEVILLE)

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

Poursuite de l'étude. Sur un système de cultures primaires de neurones issus de cortex fœtal de rat, nous avons analysé les cinétiques d'évolution de plusieurs marqueurs neuronaux, mitochondriaux et cytosquelettiques.

Nous abordons maintenant l'étude de la synaptogenèse grâce à l'anticorps contre la synaptophysine et l'apparition des canaux sodium par liaison à la saxitoxine.

Cette étude phénotypique est complétée par une analyse génétique grâce à l'emploi de sondes oligonucléotidiques et des sondes spécifiques correspondant aux 13 protéines codées par le DNA mitochondrial.

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

Nous avons suivi, avec la sonde c-myc, l'expression du messager au cours de la maturation de cerveau de souris et de la différenciation du neuroblastome par le CCA ou le DMSO. On observe une diminution de l'expression. A l'aide d'un anticorps, nous analysons actuellement la situation au niveau de la protéine.

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

Nous poursuivons l'analyse des interactions entre les génomes nucléaire et mitochondrial dans la synthèse des complexes protéiques mitochondriaux.

Nous avons notamment initié l'étude de la maturation mitochondriale au cours de la myogenèse et de la neurogenèse dans des systèmes normaux *in vitro* et *in vivo*, ces analyses servant de références pour l'étude des cas pathologiques.

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

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

Les neurones expriment, en plus des isotubulines communes trouvées dans tous les types cellulaires de l'individu, un grand nombre d'isotubulines spécifiques qui apparaissent et s'accumulent progressivement au cours de la différenciation nerveuse.

Bien que plusieurs isogènes tubuline (4  $\alpha$  et 5  $\beta$ ) soient transcrits différemment dans les neurones au cours du développement, l'expression de la majorité des isotubulines neuronales est sous contrôle post-traductionnel.

En plus de la phosphorylation de  $\beta$ '1 en  $\beta$ '2 déjà décrite, nous avons caractérisé d'autres modifications post-traductionnelles responsables de la production de nombreuses  $\alpha$ -tubulines. L'approche utilisée consiste à marquer *in vivo* les modifications, purifier les tubulines et les digérer avec des endoprotéases spécifiques, séparer les peptides obtenus sur colonne HPLC et isoler enfin le (ou les) peptide(s) radioactif(s), c'est-à-dire porteur(s) de modification. Ces peptides sont séquencés et leur masse déterminée par FAB-MS.

A ce jour, nous avons démontré que l' $\alpha$ -tubuline est acétylée sur une lysine en position 40. Cette modification, caractérisée auparavant chez *Chlamydomonas*, est donc fortement conservée au cours de l'évolution. L'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline correspond à un événement majeur dans les cellules gliales mais ne représente qu'une modification mineure en ce qui concerne les neurones (3 % des  $\alpha$ -tubulines totales dans le cerveau).

Un autre type de modification concernant les  $\alpha$ -tubulines neuronales est en cours de caractérisation. Cette nouvelle modification correspond à un événement post-traductionnel majeur dans le neurone et consisterait en une addition séquentielle de groupements chimiques identiques sur la partie C-terminale (Glu 445) de l' $\alpha$ -tubuline.

Nous pensons que le jeu combiné de ces diverses modifications pourrait moduler les propriétés structurales et fonctionnelles des isotubulines et des diverses sous-populations de microtubules dans le neurone, permettant ainsi d'assurer les besoins architecturaux et dynamiques de ces cellules (élongation neuritique, cytosquelette dendritique et axonal, transport axonal,...).

*Etude de l'expression génétique des isozymes de l'énolase au cours de la myogenèse et de la neurogenèse*

(L. LEGAULT, A. KELLER, N. LAMANDÉ, M. LAZAR, M. LUCAS)

Notre étude concerne la recherche des mécanismes moléculaires contrôlant l'expression des isozymes de l'énolase dans les tissus nerveux et musculaires. En effet la transition d'expression de l'énolase embryonnaire  $\alpha\alpha$  vers les émolases  $\gamma\gamma$  ou  $\beta\beta$ , respectivement spécifiques des neurones et des fibres musculaires striées de type II, constitue un événement marqueur de la différenciation terminale de ces deux types cellulaires.

Durant cette année notre étude a concerné plus particulièrement le système émolase du tissu musculaire squelettique.

- L'obtention d'insertions correspondant à l'ARN messenger  $\beta$  à partir d'une nouvelle banque d'ADNs complémentaires a permis de compléter la séquence partielle de cet ARN que nous avons déjà établie. Comme sa région 3' non codante, la région 5' non codante de l'ARN  $\beta$  est totalement distincte de celles des ARNs  $\alpha$  et  $\gamma$ , également hétérologues entre elles, ce qui suggère un rôle possible de ces régions dans l'expression cellulaire et ontogénique propre à chacun de ces ARNs.

- Des fragments génomiques de taille suffisante pour inclure les régions régulatrices des gènes des trois sous-unités émolase ont été clonés. Les cartes de restriction établies démontrent l'existence de plusieurs gènes et/ou pseudo-gènes dans le cas de la protéine  $\alpha$  et d'un gène unique dans le cas des

protéines  $\beta$  et  $\gamma$ . Notre analyse se poursuit actuellement au niveau du gène  $\beta$ , dans le but de sélectionner des fragments de restriction correspondant à la région située en amont du site d'initiation de la transcription de ce gène. L'identification et la structure du promoteur du gène  $\beta$  permettra de caractériser les éléments de séquence et les facteurs cellulaires qui interviennent dans la régulation transcriptionnelle de l'expression de ce gène.

- Une analyse de l'expression de l'ARN  $\beta$  dans différentes lignées myogéniques a montré qu'une accumulation importante des séquences de cet ARN coïncide avec le phénomène de fusion de ces cellules. Cependant, contrairement aux ARNs des autres protéines marqueurs de la myogenèse, l'ARN  $\beta$  est déjà exprimé dans les myoblastes prolifératifs. L'expression initiale du gène  $\beta$  observée dans une lignée mésodermique, après conversion en myoblastes par transfection d'un des gènes régulateurs des premières étapes de la myogenèse, paraît suggérer que cette expression est un événement marqueur de l'engagement d'un précurseur mésodermique vers la lignée myogénique.

L'intérêt de cette observation nous conduit à étendre l'analyse de l'expression temporelle du gène  $\beta$  au cours du développement précoce tant *in vivo* (coll. avec M. Buckingham, Institut Pasteur) qu'*in vitro* dans différentes lignées précurseurs (coll. avec M. H. Buc, Institut Pasteur). Le même type d'analyse sera appliqué pour les gènes  $\alpha$  et  $\gamma$ .

#### *Expression de la périphérine, protéine de filament intermédiaire*

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

Une banque de cDNAs de neuroblastome de souris a été réalisée dans le vecteur d'expression  $\lambda$  gt 11. Nous avons effectué la séquence de 3 clones : l'un d'eux (3u) présente une insertion de 96 paires de bases et un autre (5b) une délétion de 62 paires de bases par rapport au 3<sup>e</sup> (5g). Des expériences de cartographie avec la nucléase S1 montrent que trois ARN messagers distincts correspondent à ces trois cDNAs ; des expériences de traduction *in vitro* indiquent que l'ARN messenger à l'origine de la forme 5g code pour la forme majoritaire de la périphérine (58 kDa) tandis que ceux à l'origine des formes 3u et 5b codent respectivement pour des formes minoritaires de 61 kDa et de 56 kDa. Les trois ARN messagers proviennent de l'épissage alternatif d'un gène périphérine unique et sont donc à l'origine du polymorphisme de cette protéine.

Les conséquences de ces résultats sont de deux ordres :

- L'analyse des trois clones de périphérine indique qu'il existe au moins trois transcrits différents du gène de la périphérine. Les questions qui se posent maintenant sont :

- a) de savoir s'il existe d'autres types de transcrit ;
- b) quelles sont les modalités d'expression de ceux-ci dans les différents tissus où la périphérine est présente.

— Les différences de séquences entre les isoformes de périphérine provenant des trois transcrits impliquent des différences structurales. L'isoforme 3u avec sa séquence supplémentaire peut-elle être engagée dans les filaments de la périphérine 5g ? L'isoforme 5b, un peu plus courte que la périphérine majoritaire 5g, est probablement engagée dans les filaments ; cependant le caractère moins polaire de son extrémité C-terminale laisse supposer des interactions différentes avec les protéines environnantes.

#### *Etude des enzymes de synthèse des catécholamines*

(G. BRUNEAU, F. COGÉ, M. KRIEGER-POULLET, J. THIBAUT, C. VASSORT)

##### 1. *Clonage de la DOPA-décarboxylase (DDC) du rat*

Grâce à la traduction *in vitro* des ARN messagers isolés des phéochromocytomes, nous avons purifié sur un gradient de saccharose une fraction enrichie en l'ARNm de la DDC.

Cette fraction a servi à préparer une collection de clones d'ADN complémentaires dans le phage  $\lambda$  gt11. Ces phages ont été triés par réaction immunologique sur membrane à l'aide d'un anticorps anti-DDC. La détermination de la séquence de ces clones a été effectuée et correspond à celle de 12 peptides tryptiques de la DDC de phéochromocytome.

Par analyse selon la technique dite de « Northern » un ARN de 2 300 nucléotides codant pour cette protéine a été trouvé.

##### 2. *Etude de la structure de tyrosine hydroxylase (TH) :*

Un peptide constitué des 12 premiers acides aminés de la TH et produit par synthèse chimique a été pressenti comme formant l'épitope de reconnaissance d'un anticorps monoclonal anti tyrosine hydroxylase.

Nous avons mis au point un dosage ELISA de la TH en utilisant cet anticorps et nous avons constaté que le peptide à lui seul n'avait pas d'effet compétitif sur ce dosage, ce qui nous a permis de conclure que le domaine de reconnaissance, s'il implique cette séquence de la tyrosine hydroxylase, requiert en plus une structure particulière.

Pour résoudre ce problème, nous avons entrepris de découper la molécule de TH en petits fragments (hydrolyse par le N-chloro-succinimide et par la chymotrypsine).

Les peptides immunoréactifs seront recherchés par la technique de « Western Blot », puis chacun d'eux sera isolé et dosé par la méthode ELISA.

Cet anticorps monoclonal devrait constituer un marqueur de structure de la TH pour comprendre ses mécanismes de régulation enzymatique.

D'autre part, le rendement de la purification de l'enzyme a été amélioré et permet d'obtenir près de 30 mg d'enzyme pure pour 100g de tissu. Cela ouvre la voie aux essais physicochimiques que nous allons entreprendre en collaboration avec M. K. Andersson (Suède).

*Transfert et expression de gènes dans les cellules nerveuses. Immortalisation cellulaire et marquage génétique. Différenciation et Interactions*

(C. EVRARD, R. BERNARD, I. BORDE, E. GALIANA, M. LE BERT et P. ROUGET)

Nos travaux concernent l'étude de la différenciation et du contrôle de la division des cellules nerveuses murines ainsi que celles de leurs interactions. Dans ce cadre, nos activités peuvent schématiquement se subdiviser en plusieurs volets, cependant tout à fait interdépendants :

1. *Immortalisation et marquage génétique de cellules nerveuses*

A l'aide de différentes méthodes (transfection, électroporation, transduction rétrovirale), les gènes grand-T du virus polyome et E1A d'adénovirus ont été transférés dans diverses catégories de cellules nerveuses provenant de régions définies du cerveau (striatum, mésencéphale, cortex). Des lignées cellulaires de nature et de stades de différenciation variés (cf. § 3) ont ainsi été immortalisées. Ces lignées sont dépourvues d'un phénotype transformé et un tiers d'entre elles conservent un caryotype diploïde.

En outre, nous avons transféré, dans certaines lignées, le gène lac Z dont l'expression est aisément détectable *in situ*, ce qui permet le repérage des cellules, ouvrant ainsi des perspectives d'étude d'interactions *in vitro* et post-transplantation.

2. *Construction de vecteurs porteurs soit de gènes « immortalisants » soit de marqueurs génétiques :*

Afin d'immortaliser ou de marquer des populations cellulaires peu représentées, nous avons entrepris la construction de vecteurs porteurs de gènes immortalisants (ou du gène lac Z), associés à différents promoteurs. Par souci de clarté, nous subdiviserons ces vecteurs en trois catégories principales :

Les premiers sont des vecteurs plasmidiques, potentiellement neurotropes. Parmi eux, des vecteurs dérivant de mutants neurotropes du polyome ont été construits. D'autres constructions, en cours, font appel aux séquences en amont du gène codant pour les neurofilaments-L, clonées par J.P. Julien (Montréal). Une partie de nos efforts actuels porte sur des constructions associant ces « promoteurs » NF et des gènes soit immortalisants, soit de type lac Z.

En ce qui concerne les seconds, il s'agit de vecteurs porteurs de séquences immortalisantes placés sous le contrôle de promoteurs inductibles. Certaines constructions, du type MMTV-E1A sont achevées.

D'autre part, nous nous sommes attachés à la construction de vecteurs rétroviraux recombinants, porteurs de séquences immortalisantes placées entre les LTR du N/B M. MuLV et du virus Cas-Br-E-Mu1V. Quelques constructions impliquant les séquences grand T du polyome ont été effectuées en collaboration avec E. Rassart.

### 3. *Différenciation, Interactions :*

Parmi les lignées immortalisées, certaines présentent des caractéristiques de précurseurs bipotents. Nous avons mis en évidence plusieurs étapes pour chacune de leurs voies de différenciation et nous avons observé que l'engagement de ces lignées dans l'une ou l'autre voie, ainsi que leur plasticité dépend des conditions de croissance et de leurs interactions. Nous avons transféré le gène lac Z dans quelques-unes de ces lignées et nous approfondissons leur étude.

Plusieurs lignées expriment des récepteurs à divers neurotransmetteurs et une collaboration avec J. Prémont a été engagée à ce sujet.

### 4. *Systèmes transgéniques*

Nous avons établi une collaboration avec F. Cuzin et M. Rassoulzadegan, autour d'un projet relatif à l'établissement de lignées cellulaires immortalisées, à partir de souris transgéniques ayant intégré les séquences grand-T du polyome. Ce projet a déjà conduit à l'obtention de quelques lignées à partir d'embryons transgéniques de première génération. Ces lignées sont en cours de caractérisation. Nous pouvons envisager d'étendre ce travail à d'autres sous-populations cellulaires.

*CHIMIE BIOORGANIQUE*

La modification chimique de bases des acides nucléiques à l'aide d'un ester  $\alpha$ -acétylénique, le chlorotétrolate de méthyle, étudiée par l'équipe de M. OLOMUCKI, conduit à des dérivés comportant un groupement chlorométhyle. Les propriétés alkylantes de ce dernier peuvent être utilisées pour greffer des fragments moléculaires d'intérêt biologique sur les nucléobases modifiées.

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

(P. ROQUES, C. DUBORD et J.Y. LE GALL, en collaboration avec L. LACOMBE, Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires, Collège de France)

L'objectif poursuivi cette année a été la mise au point d'une méthode permettant d'attacher une chaîne carbonée, portant un intercalant alkylant, à un oligonucléotide anti-sens contenant une nucléobase terminale modifiée. Un tel système permettrait de stabiliser le duplex formé par l'oligonucléotide avec la séquence complémentaire virale visée.

Pour atteindre ce but, il était nécessaire de choisir un fragment intercalant adéquat muni d'une chaîne latérale terminée par un groupement fonctionnel et sélectionner ce dernier afin qu'il puisse assurer une fixation facile de l'ensemble sur la nucléobase modifiée.

En nous basant sur nos études antérieures d'un intercalant diméthoxy-2,3 azido-6 amino-9 acridine, nous nous sommes proposés d'utiliser un analogue plus simple de ce composé, comportant en position 6 non pas un azide, mais son précurseur également photoactivable, un groupement nitro. Nous avons préparé une série d'amino-9 acridines de ce type, portant sur l'azote en 9 une chaîne à 2 ou 4 méthylènes, terminée par un thiol ou une amine protégés par un groupement tri- ou diphenylméthyle ou par un acétyle. Nous avons ensuite testé, par viscosimétrie et par des mesures de températures moyennes de dénaturation, la capacité de ces composés de s'insérer dans l'ADN du thymus de veau. Ces essais ont montré que le noyau acridine étudié était un intercalant aussi efficace que le bromure d'éthidium ; ils ont aussi permis d'établir une corrélation intéressante entre la faculté d'intercalation et la longueur de la chaîne latérale et la taille du groupement protecteur terminal.

La comparaison de deux fonctions, amine et thiol, devant attacher dans des conditions douces le fragment bras-intercalant à la nucléobase modifiée, a montré que la réaction des amines avec le groupement chlorométhyle est relativement lente et s'accompagne de réactions secondaires. Par contre, un thiol réagit rapidement et complètement à pH légèrement alcalin.

En ce qui concerne la facilité de déblocage des thiols protégés terminant la chaîne latérale des dérivés d'acridine étudiés, nous avons constaté que le groupement acétyle convenait le mieux à une libération du thiol dans des conditions douces.

A la lumière de tous ces résultats, nous avons sélectionné une acridine portant un groupement acétylthio au bout d'une chaîne latérale à 4 carbones. Un essai modèle a montré qu'en milieu légèrement alcalin, ce composé substitue facilement le chlore du groupement chlorométhyle dans une adénosine modifiée. Cette méthode permet donc de préparer des oligonucléotides anti-sens fermement liés à la séquence-cible.

#### PUBLICATIONS

J.C. LARCHER, J.L. VAYSSIÈRE, F. LE MARQUER, L. CORDEAU-LOSSOUARN, P. KEANE, A. BACHY, F. GROS et B. CROIZAT, *Effects of peripheral benzodiazepines upon the O<sub>2</sub> consumption of neuroblastoma cells* (*Eur. J. Pharmacol.* 161, 197-202, 1989).

J.C. LARCHER, L. CORDEAU-LOSSOUARN, M. BASSEVILLE, F. GROS et B. CROIZAT, *Etude de l'oncogène c-myc au cours de la neurogenèse spontanée ou induite* (*Reprod. Nat. Develop.* 29, 50, 1989).

J.L. VAYSSIÈRE, L. CORDEAU-LOSSOUARN, J.C. LARCHER, F. GROS et B. CROIZAT, *Tissue specific mitochondrial proteins* (*Biochimie*, 71, 787-791, 1989).

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*, B.A.F. Rousset, éd./John Libbey Eurotext, London, Paris, 1988, 231-237).

A. WOLFF, B. DE NÉCHAUD, D. CHILLET et F. GROS (1988), *The amino-terminal domain of alpha-tubulin probed by monoclonal antibodies. Recognition of a rarely exposed epitope by the monoclonal antibody 111 B52 C2* (*Biol. Cell*, 63, 319-326).

T. MATTHES, A. WOLFF, P. SOUBIRAN, F. GROS et G. DIGHIÉRO (1988), *Antitubulin antibodies. Natural auto-antibodies and induced antibodies recognize different epitopes on the tubulin molecule* (*J. Immunol.*, 141, 3135-3141).

B. EDDÉ, Ph. DENOULET, B. DE NÉCHAUD, A. KOULAKOFF, Y. BERWALD-NETTER et F. GROS (1989), *Post-translational modifications of tubulin in mouse brain neurons and astroglia* (*Biol. Cell*, 65, 109-117).

Ph. DENOULET, G. FILLIATREAU, B. DE NÉCHAUD, F. GROS et L. DI GIAMBERARDINO (1989), *Differential axonal transport of isotubulins in the motor axons of the rat sciatic nerve* (*J. Cell Biol.*, 108, 965-971).

B. MARTIN et Ph. DENOULET (1989), *Transferrin, alpha-fetoprotein and albumin in plasma of quail-chick chimeras during embryonic development* (*J. Exp. Zool.*, 250, 162-167).

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.*, 10, 91-98, 1988).

N. LAMANDÉ, A.M. MAZO, M. LUCAS, D. MONTARRAS, C. PINSET, F. GROS, L. LEGAULT-DÉMARE et M. LAZAR, *Murine muscle-specific enolase: cDNA cloning, sequence, and developmental expression* (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 4445-4449, 1989).

M. ESCURAT, F. LANDON, M. GUMPEL, F. GROS et M.M. PORTIER, *Peripherin, an intermediate filament protein, is a developmental marker of specific neuronal populations* (in *Structure and Functions of the Cytoskeleton*. Ed. B.A.F. Rousset, Colloque INSERM / John Libbey Eurotext Ltd., 107, 169-177, 1988).

M. DERER, O. GRYNSZPAN-WINOGRAD et M.M. PORTIER, *Immunocytochemical localization of neurofilament protein « peripherin » in adult mouse adrenal chromaffin cells in culture* (*Neuroscience*, 31, 471-477, 1989).

F. GOSSELIN, M. GERVAISE, Y. NEVEUX et M.M. PORTIER (1989), *Comptes Rendus Acad. Sci.* (309, 323-328).

C. HUC, M. ESCURAT, K. DJABALI, M. DERER, F. LANDON, F. GROS et M.M. PORTIER, *Phosphorylation of peripherin, an intermediate filament protein, in mouse neuroblastoma NIE 115 cell line and in sympathetic neurons* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 772-779, 1989).

M. ESCURAT, K. DJABALI, M. GUMPEL, F. GROS et M.M. PORTIER, *Differential expression of two neuronal intermediate filament proteins, peripherin and NF-L, during the development of the rat* (*J. Neurosci.*, sous presse, 1989).

F. LANDON, M. LEMONNIER, R. BENAROUS, C. HUC, M. FISZMAN, F. GROS et M.M. PORTIER, *Multiple mRNAs encode peripherin, a neuronal intermediate filament protein* (*EMBO J.*, 8, 1719-1726, 1989).

E. BONNEFOY, P. FERRARA, H. ROHRER, F. GROS et J. THIBAULT, *Role of the NH<sub>2</sub>-terminal end of the rat pheochromocytoma tyrosine hydroxylase in the regulation of the enzyme's activity* (*Eur. J. Biochem.* 174, 685-690, 1988).

S. EL MESTIKAWY, J. THIBAUT et M. HAMON, *Regulation of tyrosine hydroxylase by calcium- and cyclic AMP-dependant protein kinases in striatal dopaminergic terminals* (in *Progress in Catecholamine Research*, 61-66, 1988).

J. GUY, J.P. HERMAN, M. LE MOAL, J. THIBAUT et A. CALAS, *Etude immunocytochimique des neurones catécholaminergiques dans les greffons mésencéphaliques transplantés dans l'hypothalamus du rat* (*C.R. Soc. Biol.*, 182, 67-73, 1988).

Ch. KONRADI, E. SVOMA, K. JELLINGER, P. RIEDERER, R. DENNEY et J. THIBAUT, *Topographic immunocytochemical mapping of monoamine oxidase-A, monoamine oxidase-B and tyrosine hydroxylase in human post-mortem brain stem* (*Neuroscience* 26, 791-802, 1988).

F. DE VITRY, J. CATELON, J. THIBAUT, S. BOURGOIN et M. HAMON, *Serotonin as a growth factor for the differentiation of monoaminergic neurons* (in *Progress in Catecholamine Research*, 585-590, 1988).

M. V. UGRUMOV, J. TAXI, A. TIXIER-VIDAL, J. THIBAUT et M.S. MITSKEVICH, *Ontogenesis of tyrosine hydroxylase-immunopositive structures in the rat hypothalamus: an atlas of the neuronal cell bodies* (*Neuroscience* 29, 135-156, 1989).

M. V. UGRUMOV, A. TIXIER-VIDAL, J. TAXI, J. THIBAUT, M.S. MITSKEVICH, *Ontogenesis of tyrosine hydroxylase-immunopositive structure in the rat hypothalamus. Fiber pathways and terminal fields* (*Neuroscience* 29, 157-166, 1989).

C. EVRARD, E. GALIANA et P. ROUGET, *Immortalization of bipotential glial progenitors and generation of permanent blue cell lines* (*J. Neurosci. Res.* 21, 80-87, 1988).

C. HETIER, J. AYALA, P. DENEFLÉ, A. BOUSSEAU, P. ROUGET, M. MALLAT et A. PROCIANTZ, *Brain macrophages synthesize interleukin-1 and interleukin-1mRNA in vitro* (*J. Neurosci. Res.* 21, 391-397, 1988).

C. LUBETZKI, C. EVRARD, P. LOMBRIL, P. ROUGET et B. ZALA, *Gene transfer an adult oligodendrocytes with the  $\beta$ -galactosidase gene: blue oligodendrocytes* (in *Trends in European Multiple Sclerosis Research*, Confavreux éd., Elsevier Publ., 121-124, 1988).

P. ROQUES, F. THOMÉ et M. OLOMUCKI, *Reaction of nucleic acid bases with  $\alpha$ -acetylenic esters. Part IV. Preparation of an alkylating derivative of tRNA<sup>Phe</sup> by conformation-specific chemical modification* (*Biochim. Biophys. Acta*, 951, 71-77, 1988).

P. ROQUES, F. THOMÉ, C. DUBORD et M. OLOMUCKI, *A new type of chemically modified tRNA as a tool for the study of tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase interaction* (*Biochim. Biophys. Acta*, 1009, 99-102, 1989).

## THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT

M<sup>me</sup> A. WOLFF, *Etude électrophorétique et immunologique du polymorphisme des tubulines* (Université Paris VI, Octobre 1988).

## DIPLOME D'ÉTUDES APPROFONDIES

M. G. DOS SANTOS, *Aspects pharmacologiques et moléculaires des récepteurs cholinergiques muscariniques. Emploi de cultures primaires de neurones comme système modèle.* (Université Paris VI, Octobre 1988).

M<sup>me</sup> F. LE MARQUER, *Etude des récepteurs périphériques aux benzodiazépines. Mécanismes d'action.* (Université Paris V, Septembre 1988).

M. A. HALTOUT, *Purification de la tyrosine hydroxylase et son immunotitration par la technique d'ELISA. Physicochimie Biologique Médicale et Para-Médicale.* (Université Paris XII, Septembre 1988).

M. G. BRUNEAU, *Mise en évidence du polymorphisme d'une protéine ubiquitaire : la L-DOPA décarboxylase de rat. Physicochimie biologique, médicale et para-médicale.* (Université Paris XII, Septembre 1988).

M<sup>lle</sup> I. BORDE, *Transfert de gènes dans les cellules nerveuses, étude de vecteurs rétroviraux recombinants neurotropes.* (Université Paris VII, Septembre 1988).

## CONFÉRENCES, INVITATIONS, PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS, SÉMINAIRES

Au cours de l'année 88-89, le Professeur François GROS a donné une série de conférences en France et à l'étranger sur les travaux se rapportant à l'étude de la myogenèse (Institut Pasteur) ou de la neurogenèse (Collège de France). Il a notamment effectué un stage prolongé au National Institute of Health (Bethesda) dans le laboratoire des professeurs G. Cantoni et M. Nirenberg. Conférence des Lauréats du Prix Nobel : *A l'aube du XXI<sup>e</sup> siècle. Menaces et Promesses*, Paris. Les Arcs. Premier Colloque Franco-Israélien sur les Neurosciences. Présentation d'une conférence. VI<sup>e</sup> Ecole Franco-Africaine de Biologie Moléculaire *Données récentes sur la biologie du développement musculaire*, Djerba. Fifth Summit Conference on Bioethics, *Biological and technical aspects of muscular diseases*, Rome. *L'Odyssée Génétique*, Marseille. Colloque Franco-Danois *Organisation et l'expression de l'information géni-*

que. *Contrôle de l'expression génétique au cours du développement musculaire*, Aarhus. 7<sup>e</sup> Congrès de la Société Internationale pour le Développement des Neurosciences. Participation au Workshop *Molecular approaches to the nervous system*, Jérusalem. Présidence du III<sup>e</sup> Colloque National sur les Maladies neuromusculaires, Bordeaux. Participation au Colloque sur les biotechnologies, *Biotechnology : realizations and prospects*, Paris. *Rôle du cytosquelette dans la neurogenèse*, Poitiers. *La biologie au seuil d'un nouveau monde*, Gretz. Participation à la *16th Aharon Katzir-Katachalsky Conference on Dynamics in Molecular and Cellular Biology*, Bruxelles.

M<sup>me</sup> Y. BERWALD-NETTER a été invitée par le Professeur W.A. Catterall à donner deux conférences 1) *Sodium channel isoforms in mamalian brain* à la Winter Conference on Brain Research, Snowbird, Utah, U.S.A. (Janvier 1989) et 2) *Pharmacology and mRNA expression of voltage-gated Na channel in mammalian brain cells in vivo and in culture*, dans le Département de Pharmacologie de l'Université de Washington, Seattle, U.S.A. (Février 1989). Elle a également été conviée par le Professeur A. Kahn à donner un séminaire à l'Institut de Recherches en Génétique de Pathologie Moléculaire, C.H.U. Cochin, Paris (Mars 1989) : *Pharmacologie et expression génétique des canaux Na voltage-dépendants durant l'ontogenèse du tissu cérébral et au cours du développement des cellules neuronales et astrogliales en culture*. Enfin elle a présenté une communication au 12th Meeting of the International Society for Neurochemistry, Algarve, Portugal (Avril 1989) : *Voltage-gated Na channel expression in cultured CNS neurons and astroglia : a comparative study*.

M<sup>elle</sup> C. ANDRÉ a participé au 12th Meeting of the International Society for Neurochemistry à Algarve, où elle a présenté une communication : *Development and pharmacological properties of muscarinic acetylcholine receptors in cultures of mouse brain neurons*. Portugal (Avril 1989).

M<sup>me</sup> A. KOULAKOFF a été invitée à donner une conférence : *Canaux ioniques et récepteurs de neurotoxines*, dans le cadre du D.E.A. de Physiologie du Développement, Université Paris VI (Janvier 1989).

M. B. CROIZAT a été invité à donner une conférence : *The mitochondrion in the neural cell*, au Pfeizer Inc. Research Center, Groton, Connecticut, U.S.A. (Juin 1989).

M. J.L. VAYSSIÈRE a été invité à donner deux conférences : 1) *Régulation de l'expression des protéines mitochondriales au cours de la neurogenèse*, dans le cadre du D.E.A. de Physiologie du Développement, Université Paris VII (Janvier 1989). 2) *Biogenèse de la mitochondrie en relation avec la différenciation neuronale*, à l'U.A. 360, Clermont-Ferrand (Février 1989). Il a participé à la 3<sup>rd</sup> International Conference on Muscle Diseases à Athènes (Septembre 1988) où il a présenté une communication : *Respiratory chain disorders in adult : biochemical and molecular studies*.

M. Ph. DENOULET, *Les isotubulines dans la différenciation nerveuse*, Lab. de Pharmacologie et de Toxicologie Fondamentales du C.N.R.S., Toulouse (28/06/88). *Les isotubulines du système nerveux : combien, où, quand, comment, et pourquoi ?* Lab. Bioquímica, Institut Gulbenkian des Sciences, Oeiras (Portugal) (11/10/88). *Polymorphisme tubuline de la cellule nerveuse*, Lab. d'Enzymologie, Gif-sur-Yvette (09/11/88). *Expression des tubulines, marqueurs de la neurogenèse, et fonctions dans le transport axonal*, D.E.A. de Biochimie Paris VI (04/02/89). *Diversité des protéines du cytosquelette et signification fonctionnelle*, Table ronde de la Réunion Annuelle du Club Français du Cytosquelette, Banyuls (30/05/89).

M<sup>me</sup> A. WOLFF, *Immunologie de la tubuline*, Lab. d'Enzymologie du C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (09/11/88).

M. B. EDDÉ, *Tubuline et différenciation neuronale*, Lab. de Biochimie des régulations cellulaires endocrines, I.N.S.E.R.M. U244, Grenoble (12/88).

M<sup>lle</sup> M. LUCAS a participé au 20th Annual Meeting of the European Brain and Behaviour Society, *Cellular and molecular aspects of the early events in neurogenesis* (Zurich, sept. 1988) et à la Conférence J. Monod, *Biologie cellulaire et moléculaire du développement* (Roscoff, oct. 1988). M<sup>lle</sup> LUCAS a présenté une communication orale à la 15<sup>e</sup> réunion scientifique annuelle du Groupe Développement (Paris, Mai 1989) : *Un événement marqueur de la différenciation musculaire, la transition de l'énolase embryonnaire  $\alpha\alpha$  vers l'énolase  $\beta\beta$  spécifique du muscle. Etude à l'aide de sondes cDNAs*. (M. LUCAS, N. LAMANDÉ, A.M. MAZO, D. MONTARRAS, C. PINSET, F. GROS, L. LEGAULT-DÉMARE et M. LAZAR).

M<sup>me</sup> M. LAZAR a été invitée à donner une conférence : *Differential expression of mRNAs for  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  enolase subunits during the development of mouse brain and muscle* (Department of Pathology Columbia University, New York, Juin 1989). M<sup>me</sup> LAZAR, également sur invitation, a donné une conférence dans l'unité I.N.S.E.R.M. U 153 (Professeur Fardeau), Paris V : *Expression différentielle des ARNm des trois sous-unités de l'énolase au cours du développement chez la souris*.

M<sup>mes</sup> M. LAZAR et L. LEGAULT-DÉMARE ont participé au Colloque de la Société de Biologie Cellulaire de France, *Mécanismes de transduction en biologie cellulaire : la transmission des signaux de la surface cellulaire au noyau* (Paris, Octobre 1988), et à la 15<sup>e</sup> Réunion Scientifique Annuelle du Groupe Développement (Paris, 8 Mai 1988).

M. N. LAMANDÉ a présenté une communication au Twelfth Meeting of the International Society for Neurochemistry (Portugal, Avril 1989) : *Expression of  $\alpha$  and  $\gamma$  enolase subunits and mRNAs in primary cultures of CNS neurons* (N. LAMANDÉ, M. LUCAS, A. KOULAKOFF, H. CAMBIER, Y. BERWALD-NETTER, L. LEGAULT-DÉMARE et M. LAZAR).

M<sup>me</sup> A. KELLER a participé à l'European Training Program in Brain and Behaviour Research, *Genetic and epigenetic control of phenotypic expression in nerve cells* (Santa Margherita, Italie, Octobre 1988).

M<sup>me</sup> M.M. PORTIER a donné plusieurs conférences : *La périphérine, marqueur de différenciation neuronale*, à l'unité I.N.S.E.R.M. U153, Professeur FARDEAU (Biologie et Pathologie Neuromusculaires) (Paris, 1988) ; aux Etats-Unis (1989) : *Peripherin, a neuronal developmental marker*, à la Rockefeller University (New York), au Department of Biochemistry (New York University), au Department of Pathology (Columbia University, New York), au Department of Neurosciences (University of Florida). Elle a présenté deux communications orales intitulées : *La périphérine, protéine de filament intermédiaire, marqueur de différenciation neuronale*, l'une au 3<sup>e</sup> Colloque National des Neurosciences (Montpellier, 1989), l'autre à la 15<sup>e</sup> Réunion du Groupe Développement I.N.R.A., Paris (1989).

M<sup>me</sup> F. LANDON, *Plusieurs protéines codent pour la périphérine, protéine de filament intermédiaire neuronale*. Réunion annuelle du Club Français du Cytosquelette (Banyuls, 1989).

M. J. THIBAUT a été invité à donner un séminaire à l'Unité de Recherche de Neurobiologie (Laboratoire de J.C. SCHWARTZ, Paris), et au Laboratoire d'Enzymologie de G. Hervé (Gif-sur-Yvette). Il a participé à l'enseignement du D.E.A. du Professeur Buvet, Physicochimie Biologique, Médicale et Paramédicale (Paris, Val-de-Marne).

M<sup>me</sup> C. EVRARD et M. P. ROUGET ont présenté deux communications : 1) *Immortalization of a glial bipotential progenitor and subsequent transfer of a genetical marker* (C. EVRARD, E. GALIANA, I. BORDE et P. ROUGET), au 4th Int. Congress of Cell Biology, à Montréal, 266, 1988 ; 2) *Generation of permanent and genetically marked neural cell lines after oncogene transfection and transduction with neurotropic retroviral vectors P* (C. EVRARD, I. BORDE, E. RASSART et P. ROUGET), au 12th Meeting of the International Society for Neuroscience, à Algarve, Portugal, 17, 1989).

#### COMMUNICATIONS AFFICHÉES

J.L. VAYSSIÈRE et B. CROIZAT ont participé au 3<sup>e</sup> Colloque National sur les Maladies Neuromusculaires à Bordeaux (Juin 1988) où ils ont présenté deux « posters » : 1) *Caractérisation moléculaire d'un déficit en cytochrome c-oxydase associé à une myopathie fatale infantile*. 2) *Un cas d'encéphalopathie familiale adulte avec déficit partiel en cytochrome c-oxydase*.

L. CORDEAU-LOSSOUARN et J.C. LARCHER ont participé au 3<sup>e</sup> Colloque National des Neurosciences à Montpellier (Mai 1989), où ils ont présenté un « poster » : *Expression de l'oncogène c-myc au cours de la neurogenèse in vitro et in vivo*.

J.C. LARCHER a participé à la 15<sup>e</sup> réunion du Groupe Développement (INRA) : Multiplication, Différenciation et Transformation Cellulaires, à Paris (Mai 1989) où il a présenté un « poster » : *Expression de l'oncogène c-myc au cours de la neurogenèse spontanée ou induite*.

M. LUCAS a présenté un poster au 3<sup>e</sup> Colloque National de la Société Française de Neurosciences (Montpellier, Mai 1989) : *Expression des sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  de l'énolase et de leurs ARNs messagers dans des cultures primaires de neurones du système nerveux central* (M. LUCAS, N. LAMANDÉ, A. KOULAKOFF, H. CAMBIER, Y. BERWALD-NETTER, L. LEGAULT-DÉMARE et M. LAZAR).

A. KELLER a présenté une communication affichée au 3<sup>e</sup> Colloque National des Neurosciences : *Obtention d'anticorps reconnaissant spécifiquement le  $\beta$  NgF de poulet à partir des séquences génomiques*.

M. ESCURAT, M. GUMPEL, F. GROS et M.M. PORTIER (1989), *Expression comparée de la périphérine et de la protéine de neurofilament 68 kDa au cours du développement*. 3<sup>e</sup> Colloque National des Neurosciences, Montpellier.

F. LANDON, M. LEMONNIER, R. BENAROUS, F. GROS et M.M. PORTIER (1989), *Multiple mRNAs encode peripherin, a neuronal intermediate filament protein*. European Symposium on the Biology of the Cytoskeleton, Helsinki.

Y. TILLET, M. CALDANI, M. BATAILLER et J. THIBAUT, *Immunohistochemical characterization of the sheep retrochiasmatic area*. (European Neurosciences Association, Zurich, Septembre 1988).

C. VASSORT et J. THIBAUT, *Etude de l'influence d'un anticorps monoclonal sur l'activité de la tyrosine hydroxylase* (1989), 3<sup>e</sup> Colloque National des Neurosciences, Montpellier.

M. KRIEGER-POULLET, F. COGÉ et J. THIBAUT, *Purification d'une protéine de fusion  $\beta$  galactosidase-AADC*, 3<sup>e</sup> Colloque National des Neurosciences, Montpellier (1988).

M. MANIER, P. MOUCHET, M. GEFFARD, N. MONS, S. MOUSSAOUI, J.G. PASSAGIA, J. THIBAUT et C. FEUERSTEIN, *Des neurones cholinergiques du complexe vagal gaudal (bulbaire et spinal) sont également de nature dopaminergique*, 3<sup>e</sup> Colloque National des Neurosciences, Montpellier (1989).

C. EVRARD, E. GALIANA et P. ROUGET, *Immortalization of murine brain cells after transfer of the adenovirus E1A or the polyoma virus large T genes*.

(Cold Spring Harbor Meeting on the Molecular Biology of SV40, Polyoma and Adenoviruses, 121, 1988).

C. EVRARD, T. RAGOT, H. RICHARD-FOY et P. ROUGET, *Glucocorticoid-controlled multiplication of brain cell lines, immortalized with a vector inducible for the adenovirus E1A gene expression* (Abs. 16th International Congress of Genetics, Toronto, 63, 1988).

E. GALIANA, C. EVRARD et P. ROUGET, *Immortalization of oligodendrocyte-astrocyte bipotential progenitors by oncogene transfer and selection of cell lines carrying an indicator gene* (Abs. 12th Meeting of the International Society for Neuroscience, Algarve, Portugal, 130, 1989).

#### DISTINCTIONS

Le Professeur F. GROS a été élevé récemment au grade de Commandeur dans l'Ordre du Mérite et il s'est vu décerner le prix de la Fondation Von Humboldt dans le cadre des relations scientifiques et culturelles entre la France et la R.F.A.