

## Biochimie cellulaire

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

Le cours n'a pas eu lieu.

### PROFESSEURS INVITÉS

Des personnalités étrangères, accueillies par le Collège de France, sur invitation du Professeur François GROS, ont donné des séries de conférences :

Le Professeurs David SHUGAR (Institute of Experimental Physics, de Varsovie) : *Benzimidazole analogue inhibitors of transcription in eucaryotic systems.*

Le Professeur Eric J. SIMON (New York University Medical Center) :  
1. Introduction : *Découverte des récepteurs et des peptides opioïdes endogènes. Biosynthèse et biologie moléculaire des peptides.* 2. *Biochimie des récepteurs I : propriétés, évidence pour l'existence de plusieurs sous-classes (types) de récepteurs.* 3. *Biochimie des récepteurs II : isolement, purification et biologie moléculaire.* 4. *Fonctions physiologiques du système opioïde endogène.*

Le Professeur Gary FELSENFELD (N.I.H., Bethesda, U.S.A., Professor of Molecular Biology). 1. *DNA supercoiling and DNA conformation.* 2. *Chromatin structure : folding of DNA in eukaryotes.* 3. *Chromatin structure and gene expression.* 4. *Developmental control of globin gene expression.*

Le Professeur George BRAWERMAN (Tufts University, Boston, U.S.A.) : *L'ARN messenger, du concept à l'état actuel.* 1. *La découverte.* 2. *Structure de l'ARN messenger à l'état fonctionnel.* 3. *Contrôle de la traduction.* 4. *Contrôle de la stabilité métabolique.*

D'autres professeurs ont donné un séminaire au laboratoire :

Le Docteur Paul CANCALON (Université de Floride, U.S.A.) : *Rôle du cytosquelette dans la régénération d'un nerf à nature embryonnaire : le nerf olfactif.*

Le Docteur M. Spyros GEORGATOS (Laboratory of Cell Biology, The Rockefeller University, New York, U.S.A.) : *Lamins, Lamina, Laminae*.

Le Docteur Paul DERER (Laboratoire de Cytologie, Université Paris VI) : *Les cellules de cajal-retzius : un modèle de mort neuronale*.

Le Docteur Drew M. NODEN (Professor of Anatomy and Embryology, Cornell University, U.S.A.) : *Patterns of cell movement and histogenesis during craniofacial development*.

Le Docteur Niels D. KJELGAARD (Professeur à l'Université d'Aarhus, Danemark) : *Oncogenèse rétrovirale : spécificité cellulaire et régulation de la transcription*.

Le Docteur Alain GHYSEN (Laboratoire de Génétique, Université Libre de Bruxelles, Belgique) : *Détermination et spécification des organes sensoriels chez la drosophile*.

Le Docteur Michel ROBERT-NICOUD (Max-Planck-Institut for Biophysical Chemistry, Department of Molecular Biology, Göttingen, R.F.A) : *3-D imaging of nuclear and cytoskeletal structures by laser scanning microscopy*.

Le Professeur Hermona SOREQ (Molecular Biology, The Hebrew University of Jerusalem) : *In vivo amplification and mutagenesis of the human cholinesterase genes*.

Le Docteur Alexander MAZO (Laboratory of Molecular Genetics National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.) : *Trithorax, a trans-acting regulator of the bithorax complex in drosophila*.

#### ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

#### BIOCHIMIE CELLULAIRE

*Etude moléculaire des isoformes cérébrales du canal Na voltage-dépendant*  
(Y. BERWALD-NETTER, G. DOS-SANTOS, S. GAUTRON, A. KOULAKOFF, H. CAMBIER, C. GRUSZCZYNSKI)

Les canaux sodiques voltage-dépendants (canaux Na) sont des constituants quasi ubiquitaires de la membrane des cellules excitables qui contrôlent l'influx sélectif des ions Na<sup>+</sup> en réponse à la dépolarisation. Ils jouent ainsi un rôle essentiel dans la genèse et la propagation des potentiels d'action — éléments essentiels de l'activité bioélectrique qui sous-tend la communication neuronale.

Dans nos travaux antérieurs, l'expression des canaux Na dans le tissu cérébral au cours de l'ontogenèse et dans des cultures de cellules du SNC a

été explorée par des méthodes pharmacologiques. En utilisant des neurotoxines spécifiques dans des essais de flux ionique, des essais de liaison et la localisation autoradiographique des récepteurs, nous avons déterminé le profil d'accumulation et les propriétés de ces canaux, et évalué ainsi la progression dans l'acquisition de la compétence fonctionnelle des neurones *in vivo* et en culture. En outre, nous avons démontré que les cellules astrogliales en culture possèdent des canaux Na voltage-sensibles dont les propriétés sont très semblables aux canaux Na des neurones sur le plan fonctionnel mais non identiques sur le plan pharmacologique.

Cette dernière observation a posé la question de la spécificité cellulaire de trois isoformes de canaux Na décrites récemment par l'équipe japonaise de Numa *et coll.* Par une approche de biologie moléculaire, ces auteurs ont identifié trois espèces d'ARN messagers codant pour des isoformes distinctes de canaux Na dans le cerveau de rat (appelés canal I, canal II et canal III). La taille de leur ARNm est de 9-9,5 kb. Les séquences nucléotidiques dans les régions codantes, potentiellement transmembranaires (hydrophobes) sont hautement conservées tandis que les séquences codantes correspondant aux segments cytoplasmiques (hydrophiles) ainsi que les séquences non-codantes en 3' des ARNm présentent peu ou pas d'homologie entre isoformes. Ces divergences ont été exploitées pour produire des sondes d'ADN complémentaire spécifiques d'isoformes. Une sonde, dite « commune », qui recouvre une région hautement conservée et hybride avec les ARNm des trois isoformes de canaux Na, a également été produite.

Par des expériences d'hybridation moléculaire (*Northern blot*) avec les sondes isoforme-spécifiques, nous avons établi que les ARNm correspondants (9-9,5 kb) sont exprimés dans des cultures primaires de neurones du SNC de rat, mais pas dans les astrocytes en culture. Leur abondance, absolue et relative, varie selon l'état de différenciation des neurones. Seule, la sonde « commune » hybride avec les ARN des cellules astrogliales et révèle un ARNm plus petit — de 7,5 kb. Ainsi, on peut conclure que les 3 isoformes du canal Na décrites précédemment sont toutes neuronales et qu'un ARNm codant potentiellement pour une quatrième isoforme est exprimé dans les cellules gliales.

Dans le but d'isoler par clonage et de caractériser la structure primaire de cette nouvelle isoforme cérébrale du canal Na, nous avons préparé (dans le vecteur I  $\lambda$ gt10) une banque d'ADNc, transcrite à partir d'ARN poly A<sup>+</sup> extraits de cellules astrogliales en culture. Par criblage de cette banque avec la sonde « commune » un premier clone (1,7 kb), correspondant à l'extrémité 3' comprenant une partie codante plus une partie non codante de l'ARNm du canal glial présomptif, a été isolé et séquencé. Nous poursuivons actuellement le criblage différentiel de la banque ADNc gliale jusqu'à l'isolement de la copie complète du canal Na glial.

*Expression des gènes DMD dans les cellules du SNC*

Y. BERWALD-NETTER, A. KOULAKOFF, en collaboration avec J. CHELLEY, J.C. KAPLAN et A. KAHN (INSERM U 129, Hôpital Cochin)

Les produits du gène codant la dystrophine, dont la déficience caractérise les dystrophies musculaires de Duchesne (DMD) et de Becker, ont été trouvés exprimés à un taux non négligeable dans le tissu cérébral. Il convenait donc de rechercher quelle est leur origine cellulaire. Pour cela, nous avons comparé le niveau d'expression des ARNm de la dystrophine dans des ARN purifiés soit à partir de cultures primaires de neurones de cerveau de souris, soit de cellules astrogliales. Une différence quantitative notable a été mesurée, les neurones contenant environ 7 fois plus de transcrits du gène dystrophine que les cellules gliales.

Etant donné que, dans le cerveau, la transcription de la dystrophine est régie par deux promoteurs dont l'un est spécifique du tissu nerveux et l'autre est le même que celui utilisé dans le muscle, il était intéressant d'analyser la spécificité neuronale ou gliale de ces deux promoteurs. Par l'emploi d'amorces appropriées dans des expériences d'amplification des transcrits en « PCR » (*polymerase chain reaction*), il a été montré que le promoteur de type cérébral est hautement spécifique des neurones. Dans les cellules gliales, par contre, l'ARNm de la dystrophine est sous la dépendance d'un promoteur de type musculaire. Au cours de la maturation des neurones en culture, le taux relatif du transcrit régi par le promoteur cerveau-spécifique augmente d'un facteur 10 alors que le taux du transcrit régi par le promoteur de type musculaire ne varie pas.

Par ailleurs, nous avons commencé à explorer la distribution cellulaire de la dystrophine par immunocytochimie. Deux préparations d'anticorps qui reconnaissent deux épitopes distincts de la dystrophine ont donné les mêmes résultats, à savoir : un marquage évident de la quasi-totalité des neurones, qui contraste avec l'absence apparente d'immunoréactivité dans les cellules astrogliales. Contrairement à la distribution sélectivement sous-membranaire de l'antigène dans les fibres musculaires, le marquage des neurones apparaît diffus (bien que non homogène) dans le cytoplasme des somas neuronaux ; plusieurs neurites sont marqués.

*Etude de la biogénèse mitochondriale au cours de la neurogénèse. Expression des oncogènes au cours de la neurogénèse*

(B. CROIZAT, J.L. VAYSSIÈRE, J.C. LARCHER, L. CORDEAU-LOSSOUARN et M. BASSEVILLE)

*1. Mitochondrie et différenciation neuronale*

L'étude de la différenciation neuronale sur des systèmes *in vivo* et *in vitro* a permis de décrire un processus de maturation mitochondriale en relation avec

la neurogénèse. Nous avons mis en évidence une mitochondrie spécifique du neurone mature.

La mitochondrie, indépendamment de sa fonction dans l'énergétique cellulaire, joue un rôle-clef dans la différenciation du neurone ; la morphogénèse neuronale, notamment, dépend de l'expression du génome mitochondrial.

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

Nous avons suivi, avec les sondes c-myc, N-myc et c-fos, l'expression des messagers au cours de la maturation du cerveau de souris et de la différenciation du neuroblastome par le CCA ou le DMSO ou par privation de sérum. A l'aide d'anticorps, nous analysons la situation au niveau des protéines.

### *Expression des isotubulines au cours de la neurogénèse.*

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

Les neurones expriment au cours de leur différenciation un grand nombre d'isoformes spécifiques de la tubuline. L'expression de ces isotubulines est contrôlée largement au niveau post-traductionnel.

Nous avons poursuivi l'analyse et la caractérisation de la nature chimique de ces modifications post-traductionnelles, principalement celles affectant l' $\alpha$ -tubuline.

Les deux produits géniques primaires  $\alpha$ -tubuline, qui sont majoritairement exprimés dans le tissu nerveux (codés par les gènes  $m\alpha 1$  et  $m\alpha 2$ ), subissent une glutamylation. Cette modification consiste en l'addition séquentielle de 1 à au moins 5 unités glutamyles, enchaînées par liaison amide alpha ou gamma, sur le gamma-carboxyle du résidu Glu 445, tout près de l'extrémité C-terminale de la molécule d' $\alpha$ -tubuline. La glutamylation est un événement majeur dans le neurone (50 % de l' $\alpha$ -tubuline totale) et interviendrait au cours du transport des microtubules dans les prolongements neuritiques. Elle semble indépendante des autres modifications associées à l' $\alpha$ -tubuline, acétylation de la lysine 40 et tyrosylation C-terminale. La fonction de la glutamylation dans le neurone est encore inconnue mais, de façon intéressante, cette modification est localisée dans le domaine de liaison de la tubuline avec des protéines comme MAP 2 ou la dynéine. En conséquence, la glutamylation pourrait jouer un rôle central dans la régulation des interactions entre la tubuline et ces protéines, c'est-à-dire dans la construction et le modelage des microtubules dans les différents sous-compartiments cellulaires du neurone.

Des anticorps dirigés contre des peptides synthétiques, mimant le domaine

C-terminal modifié de l' $\alpha$ -tubuline, sont en cours de purification. Des expériences de « binding » ont également été entreprises. Ces approches complémentaires devraient permettre de mieux caractériser la glutamylation des isotubulines neuronales et d'en étudier la spécificité et la fonction.

*Etude de l'expression des isozymes de l'énolase au cours de la myogénèse*  
(M. LAZAR, S. BROSSET, A. KELLER, N. LAMANDÉ, M. LUCAS)

L'étude en cours a pour objet la recherche des mécanismes génétiques et épigénétiques sous-jacents à l'un des événements marqueurs de la myogénèse : la transition de l'énolase embryonnaire  $\alpha\alpha$  vers l'énolase  $\beta\beta$ , spécifique des fibres musculaires striées. Une précédente étude sur des systèmes cellulaires en culture avait montré le double intérêt de l'énolase  $\beta\beta$  en tant que marqueur de la différenciation terminale des myocytes, mais également des étapes très précoces de la myogénèse. Aussi notre recherche s'est-elle poursuivie avec les objectifs suivants :

1) *Recherche des éléments de séquence du gène  $\beta$  et des facteurs cellulaires impliqués dans le contrôle de l'expression cellulaire et ontogénique de ce gène.* La région adjacente en 5' au site d'initiation de la transcription actuellement séquencée sur une longueur de 2 Kb s'est révélée contenir certains éléments régulateurs des gènes musculaires déjà caractérisés tel le site de fixation du facteur nucléaire MyoD<sub>1</sub>.

L'analyse fonctionnelle des séquences régulatrices potentielles contenues dans cette région va maintenant être entreprise.

2) *Analyse de l'expression spatio-temporelle du gène de l'énolase  $\beta\beta$  par rapport à la mise en place et au déroulement du programme de développement du tissu musculaire strié.*

Selon cette analyse, en particulier par hybridation *in situ* au cours de la somitogénèse chez la souris, l'expression initiale de l'énolase  $\beta\beta$  paraît être un événement marqueur des étapes précoces de la myogénèse également *in vivo*. L'étude de l'expression du gène  $\beta$  durant la formation des muscles de la patte est en cours.

3) *Recherche de l'influence d'effecteurs potentiels de la maturation musculaire dans l'établissement et le maintien du profil isozymique des énolases.*

Dans le muscle strié adulte, le maintien de l'innervation paraît nécessaire à l'expression de l'ARNm  $\beta$  à un niveau normal. L'étude de l'influence de l'innervation sur l'expression du gène  $\beta$  au cours du développement va maintenant être entreprise.

*Expression et fonction de la périphérine, protéine de filament intermédiaire neuronale*

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

L'étude comparée des expressions de la périphérine et d'une protéine de neurofilament (NF-L) au cours du développement du rat démontre que NF-L est exprimée dans toutes les populations neuronales, à la seule exception des neurones olfactifs, tandis que la périphérine n'est exprimée que dans certaines de celles-ci. En effet, l'ensemble des résultats que nous avons obtenus peut se résumer ainsi :

1) la périphérine n'est pas exprimée dans la plupart des neurones du système nerveux central ;

2) la périphérine est exprimée dans des neurones ayant la même origine embryologique mais des fonctions différentes : motoneurones, neurones sympathiques pré-ganglionnaires et cellules ganglionnaires de la rétine, tous originaires du tube neural ; neurones sensoriels des ganglions rachidiens et neurones sympathiques provenant de la différenciation de cellules de la crête neurale ;

3) la périphérine est aussi exprimée dans des neurones d'origines différentes mais de fonctions semblables : tous les neurones sensoriels qui peuvent être originaires du tube neural, de la crête neurale ou de placodes.

Le point commun de tous ces neurones est d'avoir des axones qui circulent, au moins sur la plus grande partie de leur trajet, à l'extérieur du système nerveux central. Ces axones doivent donc reconnaître leur trajet dans un environnement non-neuronal en réponse à des signaux provenant des tissus-cibles.

D'autre part, nous avons démontré que l'expression de périphérine ne permet pas de distinguer certaines catégories de neurones à l'intérieur d'une même population, mais que les protéines de neurofilaments (NFP) sont toujours co-exprimées avec la périphérine dans les neurones où cette dernière est présente. Or, on considère généralement que le rôle des NFP est de maintenir le diamètre des axones. Par contre, Georgatos et collaborateurs (The Rockefeller University) ont démontré que la vimentine et la desmine, protéines de filaments intermédiaires de même type que la périphérine, sont liées d'une part à la membrane nucléaire par l'intermédiaire de la lamine B et, d'autre part, à la membrane plasmique par l'ankyrine. En collaboration avec ces auteurs, il a été possible de montrer qu'il en était de même pour la périphérine. Celle-ci pourrait donc jouer un rôle dans la reconnaissance du trajet à suivre par les axones des neurones dans lesquels elle est exprimée en permettant la transmission des signaux issus de l'environnement ou des cibles spécifiques pour les diverses populations neuronales.

D'autres résultats démontrent que la régulation de l'expression des NFP serait différente de celle de la périphérine. Le clonage du gène de celle-ci, que nous venons d'effectuer, devrait nous permettre de déterminer les facteurs qui en sont responsables.

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

(G. BRUNEAU, F. COGÉ, M. KRIERGER, J. THIBAUT, C. VASSORT)

Nos travaux concernent l'étude de la régulation de l'expression génétique et de l'activité enzymatique de deux protéines de la voie de synthèse des catécholamines : la tyrosine hydroxylase (TH) et la DOPA-décarboxylase (DDC).

#### *1. Structure des ARN messagers de la DDC du rat*

La séquence nucléotidique complète de l'ARN messager de la DDC, extrait de phéochromocytome de rat, a été déterminée. Elle correspond dans la partie codante à celle trouvée par d'autres auteurs pour la DDC du rat. Cependant, nous avons montré que la partie 5' non traduite de cet ARNm est différente de celle trouvée pour l'ARNm de la DDC du foie de rat et ressemble fortement à la séquence de l'ARN codant pour la DDC de phéochromocytome humain. Nous avons démontré qu'il s'agissait d'un « splicing » alternatif de cette région qui conduit à deux modes de maturation des ARNm. L'un se produit dans les tissus d'origine ectodermique (cerveau, médullo-surrénales), l'autre dans les tissus d'origine mésodermique ou endodermique (foie, rein).

#### *2. Localisation du gène de la DOPA-décarboxylase sur les chromosomes humains*

Une sonde a été préparée par amplification génique d'un ADN de phéochromocytome humain à partir de la séquence du cDNA de rat. Cette sonde de 747 paires de bases a été marquée radioactivement et a servi à repérer sur des « Southern blots » d'hybride homme-hamster le chromosome porteur du gène DDC. Ce travail, effectué avec la collaboration du Dr. Nguyen van Cong, laisse penser que le chromosome 7 est porteur de ce gène. Ce résultat est en cours de confirmation par des techniques d'hybridation *in situ*.

#### *3. Etude de la structure de la tyrosine hydroxylase*

L'obtention de fortes concentrations de tyrosine hydroxylase nous a permis de développer des études physicochimiques de cette enzyme :

— le spectre visible met en évidence la présence d'un complexe Fe-catéchol lié à l'enzyme et responsable de la rétroinhibition de l'activité, et entraîne une coloration bleu-vert de la protéine ;

— ce complexe de rétroinhibition est formé essentiellement de fer et de dopamine.

*Transfert et expression de gènes dans les cellules nerveuses. Immobilisation cellulaire et marquage génétique. Différenciation et interactions*  
(C. EVRARD, R. BERNARD, I. BORDE, E. GALIANA, M. LE BERT et P. ROUGET)

Tout en étudiant le transfert et l'expression d'oncogènes définis et de marqueurs génétiques dans les cellules nerveuses, nous avons obtenu un éventail de lignées cellulaires permanentes correspondant à différentes catégories de cellules nerveuses et à des précurseurs de stades de différenciation variés. Les résultats obtenus montrent que l'ensemble de ces lignées devrait constituer un modèle bien adapté à l'étude des mécanismes génétiques et biochimiques intervenant dans la différenciation et le contrôle de la division des cellules nerveuses, ainsi que dans leurs interactions.

### 1. *Immortalisation et marquage génétique de cellules nerveuses*

Nous avons poursuivi notre travail de transfert d'oncogènes et de marqueurs génétiques à l'aide de différentes méthodes (transfection, électroporation, lipofection, transduction rétrovirale). Les gènes grand-T du virus polyome et E<sub>1</sub>A de l'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 ont été ainsi immortalisées. Ces lignées sont dépourvues d'un phénotype transformé et un tiers d'entre elles conservent un caryotype diploïde. D'autres lignées ont été établies par transduction du gène grand-T du virus SV40 placé dans un vecteur rétroviral recombinant.

En outre, nous avons transféré, dans certaines lignées, le gène *lac Z*, associé ou non à une séquence de localisation nucléaire. Son expression est aisément détectable *in situ*, ce qui permet de repérer les cellules et rend possible l'étude d'interactions *in vitro* et après transplantation.

### 2. *Systèmes transgéniques*

Des lignées de cellules nerveuses ont été également établies à partir de souris transgéniques porteuses du gène grand-T du virus polyome, obtenues dans le laboratoire de F. Cuzin. Les cellules de ces lignées ne présentent pas de caractères transformés et sont capables de se différencier *in vitro* en astrocytes. Nous avons entrepris d'étendre ce travail à d'autres sous-populations cellulaires.

### 3. Différenciation. Interactions

La plupart des lignées que nous avons obtenues à l'aide de ces différentes méthodes correspondent à des précurseurs capables de se différencier *in vitro*. Ces résultats sont vraisemblablement en rapport avec l'avantage sélectif que les précurseurs présentent pour l'immortalisation.

Certaines catégories de lignées sont des précurseurs astrogliaux, d'autres des précurseurs mixtes astrocyte-oligodendrocyte de type O<sub>2</sub>A, d'autres encore des précurseurs mixtes astrocyte-neurone.

Nous avons mis en évidence plusieurs étapes pour chacune de leur voie de différenciation et nous avons observé que l'engagement de ces lignées dans l'une ou l'autre direction, ainsi que leur plasticité, dépendent des conditions de croissance et de leurs interactions. Un des intérêts potentiels de telles lignées pourrait être d'identifier les gènes et les facteurs impliqués dans l'orientation et la progression de la différenciation de ces cellules.

Nous avons montré, en collaboration avec J. Premont et P. Marin, que plusieurs lignées sont caractérisées par un ensemble de récepteurs à divers neuro-transmetteurs. Nous entreprenons l'étude de l'expression de certains sous-types de récepteurs (récepteurs muscariniques et récepteurs dopaminergiques D<sub>2</sub>) en fonction de l'état de différenciation des cellules.

### 4. Construction de vecteurs permettant de cibler l'expression des gènes transférés

Afin d'immortaliser ou de marquer des populations cellulaires peu représentées, nous avons entrepris la construction de vecteurs porteurs de gènes immortalisants (ou de gène *lac Z*), associés à diverses régions régulatrices spécifiques.

La construction de certains de ces vecteurs est achevée : ainsi, les deux gènes précédents ont été placés sous le contrôle des régions promotrices du gène de la GFAP ou du gène codant pour la forme légère des neurofilaments, ou encore des séquences activatrices du virus J C. Ces séquences nous ont été données respectivement par N.J. Cowan, J.P. Julien et K. Dorries. D'une part nous abordons la construction de souris transgéniques, d'autre part nous étudions la spécificité d'expression de ces vecteurs après leur transfert dans diverses catégories de cellules nerveuses.

Nous nous sommes attachés aussi à la construction de vecteurs porteurs de séquences immortalisantes placées sous le contrôle de promoteurs inductibles. Avec le vecteur MMTV-E<sub>1</sub>A, nous avons obtenu, en collaboration avec T. Ragot, des lignées de précurseurs astrogliaux dont la croissance peut être contrôlée par la dexaméthasone. Ces lignées sont en cours d'analyse et d'autres vecteurs inductibles sont à l'étude.

## PUBLICATIONS

J. CHELLY, G. HAMARD, A. KOULAKOFF, J.C. KAPLAN, A. KAHN et Y. BERWALD-NETTER, *Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells* (*Nature*, 344, 64-65, 1990).

J. CHELLY, D. MONTARRAS, C. PINSET, Y. BERWALD-NETTER, J.C. KAPLAN et A. KAHN, *Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction : application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells* (*Eur. J. Biochem*, 187, 691-698, 1990).

I. NELSON, F. DEGOUL, B. OBERMAIER-KUSSER, N. ROMERO, C. BORRENC, C. MARSAC, J.L. VAYSSIÈRE, K. GERBETZ, M. FARDEAU, G. PONSOT et P. LESTIENNE, *Mapping of heteroplasmic mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome* (*Nucl. Acids Res*, 17, 8117-8124, 1989).

B. MIGNOTTE, J.C. LARCHER, D.-Q. ZHENG, C. ESNAULT, D. COULAUD et J. FEUNTEUN, *SV40 induced cellular immortalization : phenotypic changes associated with the loss of proliferative capacity in a conditionnaly immortalized cell line* (*Oncogène*, sous presse, 1990).

B. EDDÉ, J. ROSSIER, J.P. LE CAER, DESBRUYÈRES, F. GROS et Ph. DENOULET, *Post-translational glutamylation of alpha-tubulin* (*Science*, 247, 83-85, 1990).

S. BOYER, R. MAUNOURY, D. GOMES, B. DE NÉCHAUD, A.M. HILL et P. DUPOUEY, *The expression of GFAP and vimentin in mouse lens epithelial cells during development in vivo and during proliferation and differentiation in vitro. Comparison with the developmental appearance of GFAP in the mouse C.N.S.* (*J. Neurosci. Res.*, sous presse, 1990).

M. KAGHAD, X. DUMONT, P. CHALON, J.M. LELIAS, N. LAMANDÉ, M. LUCAS, M. LAZAR et D. CAPUT, *Nucleotide sequences of cDNAs for  $\alpha$  et  $\gamma$  enolase mRNAs from mouse brain* (*Nucl. Acids Res.*, sous presse, 1990).

A. KELLER, R. WILLIAMS, J. VAHAVIOLOS, C. AUFRAY et R.A. RUSH, *Immunohistochemical localization of Nerve Growth Factor in a subpopulation of chick spinal ganglion neurons* (*J. Neurosci. Res.*, sous presse, 1990).

M. ESCURAT, H. PHAMGIA, C. HUC, A. POUPLARD-BARTHELAIX, C. BOITARD, J.F. BACH, F. GROS et M.M. PORTIER, *A new monoclonal antibody recognizing the amino-terminal consensus sequence of vertebrate intermediate filament proteins* (*FEBS Lett.*, 253, 157-162, 1989).

M. ESCURAT, K. DJABALI, M. GUMPEL, F. GROS et M.M. PORTIER, *Differential expression of two neuronal intermediate filament proteins, periphe-*

rin and the low molecular mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat ( *J. Neurosci.*, 10, 764-784, 1990).

F. GOSSELIN, H. MAGLOIRE, A. JOFFRE et M.M. PORTIER, *Cytokeratins as molecular markers in the evaluation of the precise differentiation stage of human gingival epithelia reconstituted in vitro* (*Arch. Oral Biol.* sous presse, 1990).

C. FEUERSTEIN, R. PERETTI-RENUCCI, M. SAVASTA, B. SCATTON, M. MANIER, A. DUBOIS, J. THIBAUT, N. MONS et M. GEFFARD, *Critical review on quantitative autoradiography of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopaminergic receptors in the striatum of the mammalian brain : differential localization and plastic changes after pharmacological manipulation and dopaminergic input disruption* (*Anal. Cell. Pathol.*, 1, 153-171, 1989).

F. COGÉ, M. KRIEGER-POULLET, J.C. GUILLEMOT, P. FERRARA, F. GROS et J. THIBAUT, *Purification et séquençage partiel de la L-DOPA-décarboxylase de phéochromocytome de rat* (*C.R. Acad. Sci.*, Paris, 309, 587-592, 1989).

Y. TILLET et J. THIBAUT, *Catecholamine-containing neurons in the sheep brainstem and diencephalon : immunohistochemical study with tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine-b-hydroxylase (DBH) antibodies* (*J. Comp. Neurol.*, 290, 69-104, 1989).

M. CORIO, J. THIBAUT et J. PEUTE, *Topographical relations between catecholamine — and neuropeptide — containing fibers in the median eminence of the new Triturus alpestris. An ultrastructural immuno-cytochemical study* (*Cell Tissue Res.*, 259, 561-566, 1990).

Y. TILLET, M. BATAILLER, M. KRIEGER-POULLET et J. THIBAUT, *Presence of dopamine-immunoreactive cell bodies in the catecholaminergic group A15 of the sheep brain* (*Histochemistry*, 93, 327-333, 1990).

G. BRUNEAU, M. KRIEGER-POULLET, F. COGÉ, C. BORRI-VOTATTORNI, F. GROS et J. THIBAUT, *Characterization of DOPA-decarboxylase mRNA in rat pheochromocytoma* (*Biochimie*, 72, 73-76, 1990).

C. COUGET, C. LUBETZKI, C. EVRARD, P. ROUGET et B. ZALC, *Gene transfer of rat mature oligodendrocytes and O-2A progenitor cells with the b-galactosidase gene* (in *Cellular and Molecular Biology of Myelination*, JESE-RICH et al., éd., H43, 311-316).

N. JENSEN, A. BARON-VANEVERCOOREN, M. MATTEI, E. GALIANA, C. GURON, M. PINCON-RAYMOND, H. BARON, P. ROUGET, F. CUZIN et M. RASSOULZADEGAN, *Neurological disorder in transgenic mice which express the large T antigen of polyoma virus in the nervous system* (*Mol. Biol., Med.*, 6, 493-500, 1989).

E. GALIANA, I. BORDE, P. MARIN, M. RASSOULZADEGAL, F. CUZIN, F. GROS, P. ROUGET et C. EVRARD, *Establishment of permanent astroglial cell lines, able to differentiate in vitro, from transgenic mice carrying the polyoma virus large T gene : an alternative approach to brain cell immortalization* (*J. Neurosci. Res.*, sous presse, n° JNR 436, 1990).

C. EVRARD, I. BORDE, P. MARIN, E. GALIANA, J. PREMONT, F. GROS et P. ROUGET, *Immortalization of bipotential and plastic glio-neuronal precursor cells* (*Proc. Natl. Acad., Sci. USA*, 87, 3062-3066, 1990).

C. THÉRY, E. HÉTIER, C. EVRARD et M. MALLAT, *Expression of macrophage-stimulation factor gene in the mouse brain during development* (*J. Neurosci. Res.*, 26, 129-133, 1990).

P. ROQUES et M. OLOMUCKI (1990), *Chlorotetrolic acid ester as a structural probe of RNA* (*Nucleos. & Nucleot.*, 9 (3), sous presse).

#### THÈSE DE DOCTORAT

M. E. GALIANA, *Transfert de gènes dans les cellules nerveuses : établissement de lignées de cellules immortalisées capables de se différencier in vitro* (Collège de France, juin 1990).

M. P. ROQUES, *Applications biologiques de la modification des bases des acides nucléiques par un ester  $\alpha$ -acétylénique* (Université Paris VI, novembre 1989).

#### DIPLÔME D'ÉTUDES APPROFONDIES

M<sup>lle</sup> G. BONNE, *Etude de la mitochondrie au cours de la myogénèse* (Université Paris VII, 1989).

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

Le Professeur F. GROS ayant été dispensé d'enseignement pour la période d'octobre 1989 à octobre 1990 a effectué de nombreuses missions d'intérêt général en relation avec le MRT, la CEE, l'UNESCO, et a prononcé une série de conférences lors de ses visites d'Instituts étrangers.

Missions et déplacements pendant l'année 1989 :

Haari, FEBS-IUB Meeting au Zimbabwe (janvier) : *Frontiers in Molecular Genetics*, Conférence : *The muscle cell : a model for the study of somatic differentiation*.

Cologne, Participation au Cologne Spring Meeting (février), Conférence : *Developmental control of cytoskeletal elements during neurogenesis.*

Grenoble, Forum Européen sur la *Maîtrise des Risques en Biotechnologies* (avril), Conférence : *Evolution des connaissances sur la cellule vivante. Emergence des biotechnologies.*

Paris, Sénat, Colloque *Ethique & Société* (juin), Exposé introductif.

Moscou, Hugo Meeting sur *Le Génome Human* (juin).

Rome, 19th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (juillet), Conférence : *Multilevel control of cytoskeletal proteins during neural development.*

Roscoff, Conférences J. Monod : *Gene Regulation in Development* (septembre), Conférence : *Control of gene expression during early myogenesis.*

Madrid, Workshop : *The Present and Futur of Life Sciences and Technologies in the European Communities* (septembre), Conférence : *Molecular biology, miocrobiology, biomedicine and pharmaceutical research.*

Conférences scientifiques données en Allemagne à l'occasion de la remise du Prix Von Humbold.

Cologne (octobre), Conférence : *Gene regulatory mechanism during somatic cell differentiation : the muscle model.*

Dortmund, MIP-Biomedizin (octobre), Conférence : *Recent progress in the developmental genetics of the muscle. Consequences for the study and diagnosis of severe myopathies.*

Cologne, Institut de Biochimie (octobre), Conférence : *Molecular aspects of neuronal differentiation : studies of the cytoskeletal component.*

Würzburg, Physiologisch Chemisches Institut (octobre), Conférence : *Molecular aspects of neuronal differentiation : studies of the cytoskeletal components.*

Göttingen, MIP (octobre), Conférence : *Molecular aspects of neuronal differentiation studies of the cytoskeletal components.*

Heidelberg, MIP (octobre), Conférence : *Gene regulatory mechanisms during somatic cell differentiation : the muscle model.*

Paris, Cinquantenaire du CNRS (octobre), F. GROS Président du Comité Scientifique pour l'organisation du Colloque International, *Recherche sans Frontières*, Participation aux débats sur les grands programmes scientifiques : *le génome humain, etc.*

Paris, Sorbonne (octobre), F. GROS Responsable du Colloque, *Patrimoine Génétique et Droits de l'Humanité*, Discours introductif.

Munich, Institut für Physiologische (octobre), Conférence : *Gene regulatory mechanisms during somatic cell differentiation : the muscle model*.

Paris, Colloque *Actualités de la Régénération Musculaire et de la Jonction Neuromusculaire* (novembre), en l'honneur du 80<sup>e</sup> anniversaire du Professeur Couteaux, Conférence : *Les différentes populations de myoblastes*.

Montpellier, Colloque *Euromédecine 89* (novembre), F. GROS « Chairman » de la Session *Thérapie génétique*, Exposé introductif.

Paris, Colloque ADEBIO sur les *Biotechnologies* (décembre), Exposé introductif : *Dix ans après le Libre Blanc*.

Missions et déplacements pendant l'année 1990 :

Nancy, Forum (février), Conférence : *La Civilisation du Gène*.

Université de Regensburg, Allemagne (Professeur R. Jaenicke) (février), Conférence : *Molecular aspects of neuronal differentiation — studies of the cytoskeletal components*.

Missions en Inde (février-mars) :

Conférences données au National Institute of Immunology (G.P. Talwar) : *Molecular aspects of somatic differentiation : the muscle model*, and the other : *Dynamic aspects of cytoskeletal networks in developing neurons*, Conférence donnée au Center for Cellular and Molecular Biology (Bhargava) : *Mechanism of cell differentiation*.

Participation au Conseil Scientifique du Centre Franco-Indien : *Pour la Promotion de la Recherche Avancée (CEFIPRA)* à Bangalore.

Kronberg, Participation à la Rencontre des Ministres Européens de la Recherche sur la Bioéthique (mars). Intervention de F. GROS sur les questions éthiques liées à la recherche sur le génome et l'utilisation de matériel génétique humain.

Osaka, Japon, Colloque : *Human Frontier Science Program* (mars).

Lisbonne, Portugal (avril), Conférences données à l'Institut Gulbenkian sur invitation des D<sup>rs</sup> H. Menano et Pousada : 1) *Molecular aspects of neuronal differentiation : studies of the cytoskeletal components*, 2) *Recent progress in the developmental genetics of the muscle. Consequences for the study and diagnosis of severe myopathies*.

Participation à la Conférence Jacques Monod *The Golden Age Revisited. Regulatory Circuits in Gene Expression* (mai), Présentation d'une conférence : *Gene regulatory mechanisms during somatic cell differentiation : the muscle model*.

Genève (mai), Visite à l'Université. Rencontre avec les Doyens des Facultés et le Recteur. Séminaire donné dans le département de Biologie Moléculaire (Service du D<sup>r</sup> R. Weil), intitulé : *Dynamique du cytosquelette et différenciation neuronale*.

Participation au Colloque Franco-Soviétique : *Organisation et Expression du Génome Eucaryote et Procaryote*. Présentation d'une conférence : *Gene expression and differentiation of the muscle tissue*.

M<sup>me</sup> Y. BERWALD-NETTER a été invitée à donner une conférence intitulée : *Neuronal and glial isoforms of voltage-gated sodium channels*, dans le cadre d'une « European Winter Brain Conference », Les Arcs, mars 1990.

M<sup>me</sup> A. KOULAKOFF a donné une conférence sur *Les canaux ioniques voltage-dépendants : récepteurs de neurotoxines*, dans le cadre du DEA de Physiologie du Développement, Paris, VI, janvier 1990.

M<sup>me</sup> L. CORDEAU-LOSSOUARN et M<sup>lle</sup> G. BONNE ont présenté une communication affichée au XVI<sup>e</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, Sophia Antipolis, Nice (1989) : *Etude de certaines protéines neurospécifiques et des protéines mitochondriales au cours de la différenciation des neurones en culture primaire*.

M<sup>me</sup> L. CORDEAU-LOSSOUARN, M. J.C. LARCHER, M<sup>lle</sup> BASSEVILLE, M. F. GROS, M. B. CROIZAT et M. J.L. VAYSSIÈRE ont participé à la Réunion Internationale de la Société Française de Neurologie : *Mitochondries et Maladies du Système Nerveux*, Paris (1990), où ils ont présenté une communication : *Modifications des protéines mitochondriales en relation avec la différenciation neuronale*.

M. J.C. LARCHER a présenté deux communications : 1) *Etude de l'oncogène c-myc au cours de la neurogénèse spontanée ou induite* (15<sup>e</sup> Réunion du Groupe Développement, I.N.R.A. : *Multiplication, Différenciation et Transformation Cellulaires*, Institut Pasteur, Paris, 1989). 2) *N-myc oncogene expression during induced differentiation of mouse neuroblastoma cells* (Société de Biologie Cellulaire de France : *Mécanismes de la Différenciation. Oncogènes, Proto-oncogènes et Facteurs de Croissance*, Paris, 1990).

M. J.C. LARCHER et M<sup>me</sup> L. CORDEAU-LOSSOUARN ont présenté une communication au 3<sup>e</sup> Colloque National de la Société Française de Neurosciences, Montpellier (1989) : *Expression de l'oncogène c-myc au cours de la neurogénèse in vitro et in vivo*.

M. Ph. DENOULET a été invité à donner trois conférences : 1) *Les tubulines et la neurogénèse*, Conférences Associées au D.E.A. de Physiologie du Développement de Paris VI (novembre 1989). 2) *Differential behavior of the multiple isotubulins during axonal transport*, Cell Biology Group, Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury, Massachusetts, USA (janvier 1990). 3) *les tubulines et la différenciation neuronale : rôle dans le transport des*

*vésicules et des organites*, Conférences Associées au D.E.A. de Biochimie de Paris VI (février 1990). Il a participé à un Symposium U.C.L.A. : *Cytoskeleton and Cell Regulation*, à Steamboat Springs, Colorado, USA (janvier 1990) où il a présenté une communication : *Differential transport of the neuron-specific isotubulins in motor axons*. (*J. Cell. Biochem.* 14a, 226, 1990).

M. B. EDDÉ a été invité à donner trois conférences : 1) *Post-translational glutamylation of alpha-tubulin*, à la Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury, Massachusetts, USA (janvier 1990). 2) *Modifications post-traductionnelles de la tubuline au cours de la différenciation neuronale*, au Laboratoire de Physiologie Nerveuse, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (mars 1990). 3) *Aspects structuraux et fonctionnels des modifications post-traductionnelles de la tubuline neuronale*, Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie Fondamentales, C.N.R.S., Toulouse (mai 1990). Il a participé à un Symposium U.C.L.A. *Cytoskeleton and Cell Regulation*, à Steamboat Springs, Colorado, USA (janvier 1990), où il a présenté une communication : *Glutamylation, a new post-translational modification of alpha-tubulin in neurons* (*J. Cell. Biochem.* 14a, 227, 1990).

M<sup>me</sup> A. WOLFF a participé au Fifth Meeting of the European Cytoskeletal Club, *European Symposium on the biology of the Cytoskeleton*, à Helsinki, Finlande (juin 1989), où elle a présenté une communication : *Recognition of different epitopes on the tubulin molecule*.

Dans le cadre d'un contrat de Coopération de la Communauté Européenne, un Colloque : *Regulation of Neurite Outgrowth in Differentiating Nerve Cells* a été organisé au Collège de France du 20 au 25 avril 1990 (participants du Collège de France : F. GROS, Ph. DENOULET, B. EDDÉ, B. DE NÉCHAUD, A. WOLFF, Y. BERWALD-NETTER : participants de l'Institut Weizmann, Rehovot, Israël : U. LITTAUER, I. GINZBURG, R. HANEMAAJER, E. SADOT).

M<sup>me</sup> M. LAZAR, M. N. LAMANDÉ, M<sup>me</sup> M. LUCAS, M. D. MONTARRAS, M. C. PINSET, M. F. GROS et M<sup>me</sup> L. LEGAULT-DEMARE ont participé à l'EMBO Workshop on *Cellular and Molecular Biology of Muscle Development*, Cambridge, Angleterre (septembre 1989) où ils ont présenté une communication : *Expression of muscle-specific  $\beta$ -enolase occurs at the myoblast stage*.

M<sup>me</sup> M.M. PORTIER a été invitée à donner trois séminaires en France : 1) *La périphérine, protéine de filament intermédiaire, marqueur de différenciation neuronale* (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, novembre 1989). 2) *Expression et co-expression de la périphérine, protéine de filament intermédiaire neuronal* (Unité de Neuroimmunologie, INSERM U298, Angers, mars 1990). 3) *Cytosquelette périphérique et neuropathologie. La périphérine*, Hôpital de la Salpêtrière, Laboratoire de Neuropathologie R. Escourolle, Paris, juin 1990). Elle a également donné deux séminaires aux Etats-Unis sur

invitation : 1) *Expression and co-expression of peripherin, a neuronal intermediate filament protein* (University of Colorado, Department of Physiology, Fort Collins, mars 1990). 2) *Differential expression of peripherin and NF-1 during the development of the rat* (Albert Einstein College of Medicine, The Saul R. Korey Department of Neurology, New York, mars 1990). Elle a été invitée au 21st Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry, Phoenix, Arizona (mars 1990), où elle a participé au Workshop III : *Functional Diversity of Mammalian Neurofilaments*, ainsi qu'au Sixth Meeting of the European Cytoskeleton club (juin 1990), où elle a prononcé une conférence : *Co-expression of peripherin, a neuronal type III intermediate filament protein, with neurofilament proteins*. Elle a présenté une communication au 21st Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry, Phoenix, USA (mars 1990) : *Co-expression of peripherin and of the NF-L neurofilament protein*.

M<sup>me</sup> F. LANDON a été invitée à donner une conférence au Sixth Meeting of the European Cytoskeletal Club, à Aarhus, Danemark (juin 1990) : *Multiple mRNA species of peripherin*.

M<sup>lle</sup> F. GOSSELIN a présenté une communication au Symposium on *Borderland between Caries and Periodontal Disease : Application of Molecular Science*, à Genève, Suisse (janvier 1990) : *Cytokeratins as molecular markers in the evaluation of the precise differentiation stage of human gingival epithelia reconstituted in vitro*. Elle a présenté deux communications : l'une à la 68th General Session of the International Association for Dental Research et à la 19th Annual Session of the American Association for Dental Research, à Cincinnati, USA (mars 1990) : *Gingiva equivalent : the reconstitution in vitro of human gingiva* ; l'autre aux XI<sup>e</sup> Journées Françaises de Parodontologie, à Cannes (juin 1990) : *Reconstitution in vitro de la gencive humaine*.

M<sup>lle</sup> K. DJABALI a présenté une communication au Sixth Meeting of the European Cytoskeletal Club, à Aarhus, Danemark (juin 1990) : *Anti-iodotypic antibodies identify a consensus attachment site for intermediate filaments at the carboxy-terminal domain of nuclear lamin B*.

M. P. ROUGET et M<sup>me</sup> C. EVARD ont été invités à présenter deux communications au Congrès de l'International Society for Developmental Neuroscience, à Miami (juin 1990) : 1) *Gene transfer into murin brain cells. Immortalization, differentiation and genetic labelling of different types of bipotential neural precursor cells* ; 2) *Differentiation of immortalized murin brain cell lines and expression of neurotransmitter receptors*.

P. CLAYETTE, Y. MERROUCHE, P. ROQUES, M. OLOMUCKI et D. DORMONT, *Anti-HIV activities of novel nucleoside analogs : acyclic and tricyclic base nucleosides*, 6th International Conference on AIDS, San Francisco, 1990.