

Biochimie cellulaire

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

Tout en se réclamant d'une thématique centrale : l'étude des nouveaux gènes de régulation au cours de la différenciation du muscle, notre cours cette année s'est déroulé en deux lieux distincts.

La première partie (6 heures) a été donnée au Collège de France à Paris, tandis que la seconde (3 heures) le fut à Amsterdam, sous l'égide de la Maison Descartes. Dans l'un et l'autre cas les cours furent suivis de séminaires.

Ce qui a justifié le choix du thème rappelé ci-dessus est un ensemble très remarquable d'observations, lesquelles ont débuté il y a quelques années dans le laboratoire d'Harold Weintraub, observations portant sur l'existence d'une catégorie nouvelle d'éléments régulateurs de la myogénèse (les facteurs myogéniques) qui jouent un rôle majeur dans les toutes premières étapes du développement tissulaire, celles où, précisément, le lignage des muscles squelettiques apparaît.

S'agissant des conférences données au Collège de France, les deux premières d'entre elles furent consacrées à un rappel général des principales données issues de l'Embryologie et de la Biologie moléculaire, qui concernent la formation du mésoderme dorsal, précurseur des muscles de squelette chez les vertébrés.

L'induction du mésoderme, phénomène premier qui marque le début d'une prédestination ontogénique des territoires qui, à moyen terme, fournissent les cellules précurseurs du muscle (ou myoblastes), a fait l'objet d'une multitude de travaux. Ceux-ci ont été réalisés pour une large part chez les amphibiens et, à un moindre degré, chez le poulet ou la souris. Il est bien établi (Ogi, 1967 ; Nieuwkoop, 1969 ; Smith et Slack, 1983 ; Dale 1987) que le mésoderme, ou 3^e feuillet de l'embryon, se différencie après interaction des blastomères provenant des pôles animal et végétatif. Le mésoderme dérive

d'une composante ectodermique soumise à l'effet « inducteur » de l'ectoderme présomptif. Selon le modèle « à 3 signaux » qui dérive des études effectuées chez l'embryon de Xénope, les premiers signaux émaneraient de l'hémisphère végétatif : l'un sur le côté dorsal (DV) induisant la notochorde et une partie des muscles, l'autre sur la position ventrale (VV) induisant les éléments figurés du sang, le mésothélium et le mésenchyme. Un 3^e signal, provenant du mésoderme dorsal nouvellement induit, aurait pour fonction de « dorsaliser » le mésoderme ventral adjacent.

Chez les mammifères, la souris en particulier, on possède un relevé chronologique précis des événements : formation de l'embryon proprement dit à partir de l'ectoderme primitif ; apparition d'un sillon (ligne primitive) se creusant dans la direction postérieure → antérieure, internalisation des cellules de l'ectoderme qui fournissent, outre l'endoderme, les deux populations mésodermiques (latérale et para-axiale) ; régression du nœud de Hensen avec apparition de la notochorde ; séparation du mésoderme para-axial en deux bandes de mésenchyme : les plaques segmentaires. Leur « épithélialisation » séquentielle donnera les *somites* (Hogan, 1985). Quoique l'essentiel des tissus non musculaires des membres dérive du mésoderme latéral (squelette, cartilage, tendons, enveloppes musculaires), tous les myoblastes précurseurs des muscles squelettiques proviennent du mésoderme somitique (initialement para-axial), dont les cellules migreront pour former les bourgeons des membres (voir expériences de transplantation de N. Le Douarin). La différenciation ultérieure des somites passe par la formation du *sclérotome* (notochorde, colonne vertébrale) et du *dermomyotome*. Une partie des cellules du *dermomyotome* (au contact de l'ectoderme) fourniront le *dermatome* (derme du tronc et quelques cellules musculaires), les autres conduisant à la formation du myotome (muscles paravertébraux, intercostaux et, pour partie, abdominaux). De la région ventrolatérale du *dermomyotome* migre une autre population de cellules qui va engendrer les myoblastes pour tous les muscles des membres, ainsi qu'une partie des muscles du tronc (la formation des muscles de la tête répond à une séquence plus complexe).

Il est établi que les cellules d'un somite ont une capacité de régionalisation bien définie : elles vont coloniser les territoires musculaires présomptifs qui lui sont adjacents, mais cette reconnaissance régionalisée n'est pas prédéterminée au sein des cellules somitiques. Ce sont au contraire les cellules dermiques ou squelettiques qui expriment cette morphogénèse régionalisée. Quant aux motoneurons, ils ont une prédétermination spatiale, et émettent leurs axones vers des cibles musculaires définies, sans doute par suite d'un processus « d'imprégnation positionnelle ».

Après avoir examiné les rôles respectifs des facteurs d'adhésion ou de matricage cellulaires (N. Cadherine fibronectine, N-CAM, etc.) dans le regroupement des cellules au cours de la somitogénèse, nous avons abordé en

détail l'analyse des expériences mettant en lumière les facteurs d'induction du mésoderme (TGF- β ; F.GFF produits des oncogènes int2 et bst/Ks). Ces expériences ont été réalisées pour l'essentiel dans les groupes de Smith (1987), I. Dawid et F. Rosa (1988), Kiemelman et Kirschner (1987). Non seulement il a été possible de démontrer l'apparition de ces facteurs (ou de leurs messagers) au stade convenable du développement précédant l'apparition du mésoderme, mais des mélanges appropriés de ces facteurs ajoutés à des explants de l'hémisphère « animal » provenant de blastulas de Xénope déclenchent la conversion de ces cellules ectodermiques en mésoderme, puis en myoblastes.

Divers auteurs ont suivi les premières manifestations biochimiques de cette « induction » *in vitro*, en mesurant l'expression des gènes connus pour être activés à un stade très précoce de la myogénèse (α -actine, β -énolase, chaîne légère de myosine, MLC1A, desmine). F. Rosa (1989) ; Ruiz Altuba et Melton (1990) ont également mis en évidence l'expression induite de deux gènes codant pour des protéines à homéodomains. Il s'agit de : Mix-1 (endoderme prospectif) et de X-Hox-3 (mésoderme). Les gènes *twist* (drosophile) ou assimilés (X-*twi* chez la souris) interviennent également dans la formation du mésoderme, mais il s'agit plutôt ici du mésoderme à l'origine des organes internes (pas d'apparition des somites, Hopwood et coll., 1989). Le gène T a également été récemment impliqué dans la formation du mésoderme de souris. Enfin, les gènes de la famille MyoD (voir ci-après) permettent, par leur chronologie d'expression, de « marquer » ces événements précoces. Alors que chez le Xénope, Hopwood, Gurdon et Pluck (1989) observent une expression de MyoD précédant, dans le mésoderme et les somites, celle de l' α -actine, chez la souris, en revanche, les transcrits de MyoD ne sont décelés dans les myotomes qu'au jour 10.5 (*post coïtum*), la myogénine apparaissant avant. C'est le gène Myf 5 qui est le plus précoce. Son activité se décèle dès le jour 8 dans le dermomyotome. Des transcrits Myf 5 sont également caractérisés de façon très précoce dans les cellules des bourgeons de patte, avant ceux des gènes MyoD et myogénine.

Les deux conférences suivantes ont été consacrées à la caractérisation et à l'étude physicochimique des facteurs myogéniques de la famille MyoD (souvent dénommés facteurs de détermination). On sait que le point de départ fut l'observation (Taylor et Jones, 1978) selon laquelle l'incorporation de l'analogue 5-azacytidine dans des cellules d'une lignée mésodermique en culture (la lignée 10T1/2 provenant de la souris C3H) provoque l'apparition, après quelques divisions, d'un pourcentage élevé de myoblastes (25 %) à côté d'autres « dérivés » mésodermiques (chondroblastes, adipocytes). En tirant partie de l'hybridation « soustractive » entre les cellules de Mb ainsi produites et leurs précurseurs, Lassar, Weintraub et coll. sont parvenus à caractériser, après clonage, un cDNA capable, après transfection, de convertir les cellules 10T1/2 en myoblastes avec une très grande efficacité. La protéine correspondante, baptisée MyoD-1, a été primitivement considérée comme étant le seul

et unique facteur de détermination dans l'apparition des lignages myogéniques. Peu à peu cependant, d'autres laboratoires (W. Wright., H. Arnold, Konieczny, etc.) ont réussi à identifier des gènes présentant des caractéristiques structurales et des fonctions très similaires à celles du gène MyoD-1. A l'heure actuelle (hormis le gène MyD d'Emmerson, qui n'est pas encore caractérisé), on connaît 4 gènes « myogéniques » à fonction régulatrice précoce : MyoD, myogénine, Myf 5 et MRF4 (des noms différents leur sont donnés selon les espèces dont ils proviennent).

Les quatre protéines présentent une organisation et renferment des motifs semblables ; on y distingue : a) une région acide (N-terminale) impliquée dans l'activation de la transcription en liaison avec la RNA polymérase II ; b) une région dite « en doigts de Zn » (*Zn finger*) riche en cystéine et histidine, conformation souvent présente dans les facteurs de régulation se liant à l'ADN ; c) cette région est suivie à son tour d'une région basique qui intervient dans l'interaction protéine-ADN et renferme 23 résidus d'acides aminés ; d) dans une portion C-terminale, figure enfin un motif chimique particulier, ou motif HLH (*Helix-Loop-Helix*) comprenant 2 α -hélices séparées par une région peptidique en boucle flexible. Cette région HLH est un élément clé- dans la constitution de complexes interprotéiques, qu'il s'agisse d' homo- ou d'hétérodimères, les appariements intéressant les structures α -hélicales. Il a été montré par des expériences de transfection que l'ensemble « région basique + motif HLH » (environ 60 acides aminés) suffit à provoquer, après transfection du DNA correspondant, la conversion des cellules de mésoderme en myoblastes.

Par la suite, il a pu être établi que cette région « critique » (HLH) se retrouvait dans un très grand nombre de produits de gènes régulateurs du développement de la Drosophile (*achaete-scute*, *twist*, *daughter-less*, *hairy*, *Enhancer of split*), intervenant le plus souvent dans la neurogénèse, mais aussi dans des protéines régulatrices à localisation ubiquitaire, tels les facteurs E12 et E47 (Murre et coll., 1989).

Sans entrer dans les détails, les études très fouillées, que nous avons passées en revue, démontrent :

- 1) que les gènes de cette famille MyoD opèrent en réseau intégré (chaque produit de gène peut en général activer les autres gènes) ;
- 2) les protéines correspondantes peuvent se dimériser ;
- 3) toutes ces protéines ont pour cible, sur l'ADN, une séquence « enhancer », appelée « *core sequence* » (CANNTG), où N peut-être une base quelconque ;
- 4) pour se fixer avec une affinité suffisamment élevée à ce site spécial, chacune des protéines « myogéniques » doit former des hétérodimères avec, soit la protéine E12, soit la protéine E47. C'est cette formation de combinaisons moléculaires (qui n'est pas sans rappeler l'interaction des protéines

« Jun » et « Fos », à motifs du type « Leucine Zipper ») qui constitue le fait saillant.

5) Enfin, certaines protéines, dépourvues de région basique, tel le facteur Id (Benezra et coll., 1990) ont la remarquable propriété de se combiner à E12 ou à E47, sans que le complexe formé s'attache à l'ADN. Cette séquestration empêche E12 et E47 d'activer les protéines myogéniques. Les débuts de la myogénèse doivent donc faire intervenir une destruction du facteur Id, la libération de E12 (ou E47) du complexe inactif, et la formation d'un hétérodimère entre MyoD (myogénine, Myf 5 ou MRF4) d'une part, et E12 (ou E47) d'autre part.

Dans le reste de ce cours nous avons passé en revue les travaux de Biologie moléculaire qui ont servi à « disséquer » les diverses fonctions attribuables aux sous-domaines (motifs) présents dans les protéines de la famille MyoD.

Dans les deux derniers cours, nous avons envisagé d'autres aspects du rôle physiologique des facteurs myogéniques : a) les interactions entre oncogènes cellulaires (c-ras, c-fos) et les facteurs myogéniques : en effet il a été établi que les produits de ces « oncogènes » antagonisent les effets de la protéine MyoD lorsqu'ils sont exprimés à des niveaux cellulaires élevés ; b) l'effet antimitotique puissant de la protéine MyoD : cet effet est sans doute à prendre en compte si l'on se souvient que l'arrêt des divisions dans une population de cellules blastiques précède le plus souvent le déclenchement des processus de différenciation ; c) les effets exercés par MyoD en tant qu'agent (expérimental) de trans-détermination : on entend par là la propriété remarquable que possède le gène MyoD, une fois transféré artificiellement dans des cellules, même non mésodermiques (telles que des cellules de fibroblastes, de neuroblastomes, d'adipocytes ou d'ostéoblastes), d'y induire des changements morphologiques prononcés (allongements) ainsi que l'expression de divers gènes codant pour des phénotypes musculaires.

Dans ces cours, nous avons également discuté du polymorphisme des facteurs myogéniques et des arguments suggérant un rôle préférentiel de Myf 5 (D. Montarras, C. Pinset, M.O. Ott) à l'étape de détermination, de MyoD + myogénine, lors de la conversion des myoblastes en myotubes, et de MRF4, dans les phases plus tardives de la maturation musculaire.

Quant aux cours donnés à la maison Descartes à Amsterdam, le premier a repris d'une façon synthétique certaines des données essentielles exposées dans mes conférences du Collège de France, le second ayant été consacré aux approches moléculaires récentes à l'étude des maladies neuromusculaires (en particulier les travaux consacrés à la découverte du gène DMD, affecté dans la myopathie dégénérative de type Duchenne, ainsi qu'à la dystrophine, produit de ce gène). On trouvera ci-après la liste des séminaires qui ont accompagné ces cours et les noms des scientifiques sollicités.

F. G.

SÉMINAIRES

(à Amsterdam, Maison Descartes, dans le cadre du cours de François GROS) :

Christian PINSET (Institut Pasteur, Paris), *Evidence for hierarchy within the MyoD. Regulatory factor family.*

Jean-Claude KAPLAN (Professeur, Laboratoire de Biochimie Génétique, Groupe Hospitalier Cochin, Paris), *Duchenne and Becker Muscular Dystrophies : from the gene to the protein.*

(au Collège de France) :

Marc FISZMAN (Institut Pasteur, Paris), *Epissage alternatif et gènes de la tropomyosine.*

Robert WHALEN (Institut Pasteur, Paris), *Les gènes de myosine et leur régulation.*

Alain GHYSEN et Christine DAMBLY-CHAUDIÈRE (Université Libre de Bruxelles), *Gènes et déterminisme cellulaire : la formation des organes sensoriels chez la drosophile.*

PROFESSEURS INVITÉS

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

M. Günter BLOBEL (Professeur à l'Université Rockefeller, New York) :
 1. *Protein translocation across the endoplasmic reticulum : Signal sequence recognition and targeting.* 2. *Protein translocation across the endoplasmic reticulum : Channels and pumps.* 3. *Protein import into mitochondria and chloroplasts.* 4. *Nuclear pore complexes and gene gating.*

M. Pran TALWAR (Directeur de l'Institut d'Immunologie de New Delhi) :
 1. *Infertility due to immunological factors ; Immunological approaches to contraception.* 2. *Vaccines for control of fertility and reproductive hormone dependent cancers.* 3. *Conversion of a concept into a product, problems of overcoming genetic restrictions in immunological response and carrier induced epitope specific immunosuppression.* 4. *Leprosy, a model of human graded immunodeficiency disease : Rationale of an immunotherapeutic vaccine and results of phase III large scale human trials.*

D'autres professeurs ont donné un séminaire au laboratoire :

Arne SCHOUSBOE (Université de Copenhague) : *Excitatory amino acid (EAA) induced cytotoxicity in cultured neurons : Correlations with other EAA mediated events.*

Catherine DULAC (Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire, Nogent sur Marne) : *Etude moléculaire et cellulaire de la différenciation des cellules gliales périphériques.*

Darel A. BUTLER (Laboratory of Dr. Stanley B. Prusiner, University of California, San Francisco) : *PRIONS « Novel CNS infections agents ».*

Spyros GEORGATOS (EMBL. Heidelberg) : *The eye lens as a model system to investigate the intermediate filament-membrane interaction.*

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

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

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

1. Mitochondrie et différenciation neuronale

En utilisant un système de cultures primaires de neurones, nous avons décrit un processus de maturation de la mitochondrie au cours de la différenciation neuronale, qui consiste en :

- une accumulation biphasique des protéines mitochondriales ; la première phase d'accroissement étant en relation avec l'initiation de la morphogénèse (formation des cônes de croissance et élongation neuritique), la seconde phase avec la différenciation terminale des cellules (stabilisation des réseaux axoniques, existence de potentiels post-synaptiques *in vitro*). Cette accumulation des protéines mitochondriales est corrélée à une augmentation du nombre de mitochondries et de la capacité oxydative mitochondriale ;
- des modifications du phénotype moléculaire de la mitochondrie (variations dans l'abondance relative des protéines ubiquitaires ; apparition au cours de la neurogénèse de protéines ubiquitaires et neurospécifiques) ;
- l'apparition d'une hétérogénéité mitochondriale intracellulaire.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux régulations qui sous-tendent les changements observés au niveau de la mitochondrie. Nous avons étudié les événements génétiques intramitochondriaux : réplication, transcription et traduction du mt-ADN ; nous avons pu ainsi mettre en évidence que la nature du contrôle de l'expression du génome mitochondrial variait en fonction des stades de la neurogénèse. Au cours des étapes précoces, le contrôle semble situé au niveau réplicatif, impliquant une transcription et une traduction constitutives, alors que dans les phases plus tardives, les régulations post-transcriptionnelles semblent prédominantes.

2. Nous avons étudié l'expression d'oncogènes nucléaires lors de l'induction des cellules de neuroblastome murin. Nos résultats nous ont permis d'attribuer un rôle important à l'oncogène c-myc dans la prolifération cellulaire et à l'oncogène N-myc dans l'initiation de la différenciation.

Nous avons ensuite confirmé cette hypothèse en utilisant des oligonucléotides antisens susceptibles de bloquer spécifiquement l'expression des oncogènes c-myc et N-myc dans les cellules de neuroblastome en phase de croissance exponentielle.

3. *Etude du motoneurone*

Nous initions un programme d'étude du motoneurone humain et murin. Il s'agit :

1 - de tenter d'identifier des marqueurs du motoneurone et de suivre leur évolution au cours de l'ontogénèse ;

2 - d'initier une approche originale des interactions motoneurones-cible musculaire basée sur la comparaison, grâce à un système informatique, des protéines extraites de moelle épinière et de muscles normaux et pathologiques.

Expression des isotubulines neuronales

(P. DENOULET, B. EDDÉ, A. WOLFF, B. de NÉCHAUD, D. BOUCHER, S. AUDEBERT, D. CHILLET et 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.

La modification majeure des α -tubulines dans le neurone est la polyglutamylation, qui consiste en l'addition séquentielle de 1 à au moins 5 unités glutamyles sur le gamma-carboxyle du résidu Glu 445, tout près de l'extrémité C-terminale de la molécule. La tyrosylation-détyrosylation est une autre modification post-traductionnelle de l' α -tubuline, connue depuis longtemps et de nature ubiquitaire. Elle concerne l'acide aminé C-terminal de l' α -tubuline, la Tyr 451, située à 5 résidus seulement de la polyglutamylation. Compte tenu de la proximité de ces deux modifications, nous avons recherché une interférence éventuelle entre ces deux événements. Nos résultats ont montré que le degré de polyglutamylation de l' α -tubuline n'influeait en rien sur la tyrosylabilité de la molécule, ce qui suggère que ces modifications sont indépendantes et qu'elles pourraient être alors impliquées dans des fonctions distinctes dans le neurone. Cependant, ces études ont montré qu'une fraction substantielle de l' α -tubuline était réfractaire à la tyrosylation, correspondant à la « tubuline non-tyrosylable » déjà décrite. En collaboration avec L. Paturle-Lafanechère et D. Job (C.E.N. de Grenoble), nous avons montré que cet état non-tyrosylable résultait d'une autre modification post-traductionnelle de l' α -tubu-

line, consistant en la délétion du résidu subterminal Glu 450, celui justement chargé de recevoir la tyrosine.

Acétylation mise à part, toutes les modifications post-traductionnelles de la tubuline décrites jusqu'à présent sont concentrées dans les domaines C-terminaux des deux sous-unités α et β , là où s'exprime également toute la diversité génétique entre les divers isogènes de tubuline. Il est extrêmement frappant de constater que les domaines de liaison de la grande majorité des MAPs (MAP1, MAP2, Tau, moteurs moléculaires...) sont justement ces régions C-terminales de la tubuline, ce qui suggère fortement que cette diversité chimique, et en tout premier lieu celle apportée par les différentes modifications post-traductionnelles, sert à moduler les interactions protéine-protéine pour contrôler la structure et les fonctions du cytosquelette microtubulaire.

Dans le but d'étudier l'incidence de ces modifications chimiques de la tubuline sur l'organisation structure-fonction des microtubules, nous avons engagé, d'une part, une analyse des protéines Tau dans le neurone. Nos premiers résultats montrent une hétérogénéité exceptionnelle de ces protéines : plus de 60 espèces distinctes existent dans le neurone et apparaissent séquentiellement au cours de la différenciation. D'autre part, nous avons produit des anticorps poly- et monoclonaux dirigés contre la région C-terminale de l' α -tubuline en utilisant des peptides synthétiques polyglutamylés comme immunogène. Ces anticorps sont en fin de caractérisation et leur utilisation devrait permettre d'étudier la spécificité et la distribution de la polyglutamylation ainsi que de mieux comprendre son rôle.

Régulation de l'expression des gènes de l'énolase au cours du développement du muscle strié

(M. LAZAR, S. BROSSET, A. KELLER, N. LAMANDÉ, M. LUCAS)

L'un des événements marqueurs du développement musculaire est la transition de l'énolase embryonnaire $\alpha\alpha$ vers l'énolase $\beta\beta$, spécifique des myofibrilles striées. Nous avons poursuivi l'étude de la régulation de cette transition isozymique par deux approches complémentaires :

— l'analyse des modalités d'expression des gènes codant pour les sous-unités α et β de l'énolase *in vivo*, depuis les premières étapes de la myogénèse. Cette analyse a pour objectifs, en particulier, de situer le gène β dans la chronologie d'expression des gènes régulateurs de la myogénèse déjà connus (famille MyoD) et d'identifier certains des signaux physiologiques susceptibles de moduler l'expression des gènes α et β ;

— la recherche, à partir de fragments génomiques clonés, des séquences nucléotidiques et des protéines nucléaires impliquées dans la régulation transcriptionnelle de ces gènes.

1. *Expression spatio-temporelle des gènes α et β au cours de la myogénèse*

Cette étude a été effectuée par hybridation *in situ* et immunohistochimie sur coupes d'embryons de Souris (collaboration avec l'équipe de Margaret Buckingham, Institut Pasteur) ainsi que par des analyses quantitatives en « Northern et Western blots ». Parmi les résultats obtenus, on peut souligner que :

— les transcrits du gène β sont détectables dans les premiers muscles striés qui se forment dans l'embryon : le tube cardiaque (E7,5) et les myotomes. Au cours de la somitogénèse, l'expression initiale du gène β coïncide avec celle du gène de l'actine α cardiaque et du gène régulateur « Myogénine » mais précède de deux jours celle du gène MyoD. Le gène β fait donc partie d'un petit groupe de gènes spécifiques du phénotype mature des muscles striés qui sont activés à des stades très précoces de la myogénèse. A ces mêmes stades de développement le gène α est exprimé à haut niveau de façon ubiquitaire. Nous avons pu également montrer que la protéine β était exprimée dans le cœur embryonnaire et les myotomes ;

— dans les muscles des membres postérieurs, transcrits et protéine β sont détectables à E13.5, fort probablement dans les fibres issues des premiers myoblastes qui colonisent le bourgeon de membre, mais l'expression majeure du gène β dans la période prénatale coïncide avec la formation des fibres secondaires. Une deuxième vague d'expression du gène β accompagne la maturation musculaire post-natale. Le profil de développement observé suggère une influence importante de l'innervation et de l'hormone thyroïdienne sur l'expression développementale du gène β . Des premières données indiquent déjà un rôle critique de l'innervation dans le maintien du « phénotype éolase » adulte ;

— la transition isozymique post-natale d' $\alpha\alpha$ vers $\beta\beta$ résulte essentiellement d'une régulation différentielle du niveau des transcrits des gènes α et β .

Ainsi, l'étude de la régulation de l'expression des gènes α et β devrait se révéler très informative à plusieurs niveaux du déroulement du programme myogénique.

2. *Structure et régulation transcriptionnelle des gènes α et β*

Nous avons précédemment cloné et partiellement séquencé le gène β . Nous avons cette année :

— préparé et caractérisé une sonde intronique qui va permettre le clonage du gène α fonctionnel (nous n'avions isolé jusqu'ici que des pseudogènes épissés) ;

— établi la séquence complète du gène β (6 Kb) ;

— entrepris l'analyse fonctionnelle de la région amont du gène β (séquencée sur une longueur de 2 Kb) ; la présence dans cette région de plusieurs sites de fixation de facteurs trans-activateurs connus a orienté le choix des

premières constructions qui seront prochainement éprouvées par transfection dans des cellules musculaires et non musculaires.

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

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

Le but des études que nous avons effectuées au cours de cette année et que nous poursuivons actuellement est de comprendre le rôle de la périphérine dans les populations neuronales où elle est exprimée. Ces neurones d'origines embryologiques diverses (tube neural, crête neurale, placodes) et de fonctions différentes (moteurs, sensoriels, sympathiques) ont cependant un point commun : ils circulent, au moins sur la plus grande partie de leur trajet, à l'extérieur du système nerveux central. L'ensemble des travaux effectués concernant la nature et la régulation de l'expression de la périphérine et la recherche de la fonction de cette protéine peut se résumer ainsi :

1. *Expression transitoire de la périphérine au cours du développement*

La périphérine ainsi que les protéines de neurofilament sont exprimées au cours du développement du rat dans les ébauches de la médullo-surrénale et du pancréas ; cette expression n'est observée ensuite ni dans ces organes chez l'adulte, ni dans les tumeurs qui les affectent (phéochromocytome pour la médullo-surrénale, insulinome pour le pancréas). Par contre, ces protéines sont exprimées dans les lignées cellulaires dérivant de ces tumeurs : PC 12 dans le premier cas et RIN 5F dans l'autre. Ces résultats posent à nouveau le problème de l'origine embryologique du pancréas, ainsi que celui de la différenciation progressive de certains types de cellules endocrines.

2. *Régulation de l'expression du gène périphérine*

La séquence complète du gène de la périphérine a été effectuée en collaboration avec le D^r Vadim Karpov (Institut de Biologie Moléculaire de l'Académie des Sciences de l'Union Soviétique). Diverses constructions ont été effectuées et l'étude des séquences régulatrices est en cours.

3. *Etude des différentes formes de périphérine*

Nous avons démontré précédemment l'existence de trois ARN messagers différents provenant de l'épissage alternatif du produit de transcription d'un gène unique. A chaque ARN messenger correspond une forme de périphérine ; on a ainsi une forme majoritaire de masse moléculaire 58 kD et deux formes minoritaires de 61 et 56 kD respectivement. Les séquences de ces dernières

doivent entraîner des modifications dans la constitution du réseau formé par la périphérine.

Nous recherchons actuellement ces trois formes dans différents tissus exprimant la périphérine et provenant de diverses espèces afin de savoir si ces formes sont exprimées ou non, en quelles proportions et avec quelle localisation cellulaire éventuellement.

4. *Liaison de la périphérine aux membranes nucléaire et plasmique*

Les travaux effectués par K. Djabali à l'Université Rockefeller démontrent que la lamine B, protéine de filament intermédiaire liée à la membrane nucléaire, est un site d'attachement physiologique pour la périphérine. Des résultats préliminaires indiquent qu'elle serait liée à l'ankyrine située sur la face interne de la membrane plasmique. La périphérine formant ainsi un réseau reliant la membrane plasmique au noyau pourrait peut-être jouer un rôle dans la transduction des signaux exogènes.

Etude des enzymes de synthèse des catécholamines

(G. BRUNEAU, M. KRIEGER, J. THIBAUT, C. VASSORT)

Nous avons entrepris une étude *de novo* de la DOPA décarboxylase de rat il y a 5 ans. Ce travail nous a conduits à purifier la DDC, à en préparer un anticorps, à caractériser son ARN par sa traduction *in vitro* et à cloner l'ADNc. Ce travail a été effectué en partant de phéochromocytome de rat transplantable. L'analyse et la comparaison des séquences de l'ARNm de phéochromocytome de rat avec celui du phéochromocytome humain et de foie de rat nous a conduits à la découverte de séquences conservées entre les deux espèces. La similitude des séquences entre l'homme et le rat est très forte pour la partie codante ; par contre, entre les ARN de la même espèce, provenant d'organes différents : foie, rein ou médullo-surrénale et cerveau, les parties non codantes en position 5' sont différentes. Seul un mécanisme d'épissage alternatif peut rendre compte de cette situation et permet de prévoir l'existence d'au moins deux promoteurs.

Nos résultats ont donc révélé deux types d'ARNm de la DDC dont les séquences 5' étaient différentes, ce qui laissait présumer que l'expression de ces ARNm dépende de signaux propres à l'origine embryologique du tissu : ectodermique pour les tissus nerveux et neuro-endocrinien, mésodermique ou endodermique pour les autres (foie, pancréas, rein, muscle).

Le gène DDC a été localisé sur le chromosome 2 de la drosophile. Il s'agit d'un gène unique chez les mammifères, et l'on ne soupçonne pas l'existence de pseudogène. Nous venons de découvrir que, chez l'homme, c'est le

chromosome 7 qui contient ce gène mais il ne nous a pas encore été possible d'en situer avec précision le locus sur le chromosome.

Immortalisation, transformation et marquage génétique de cellules nerveuses et précurseurs. Etude de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et les interactions cellulaires

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

Nos recherches ont pour objectif général de contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires intervenant dans la différenciation, les interactions et le contrôle de la division des cellules nerveuses et de leurs précurseurs. Après avoir initié de nouvelles méthodologies, basées sur le transfert d'oncogènes définis et permettant l'immortalisation des différentes catégories de cellules nerveuses, nous avons développé un travail comportant plusieurs volets interdépendants.

1. *Immortalisation de cellules nerveuses, établissement de lignées permanentes*

Nous avons poursuivi l'étude du transfert, de l'intégration et de l'expression d'oncogènes viraux « immortalisants » dans diverses cellules nerveuses. Nous avons ainsi établi différents types de lignées immortalisées et non phénotypiquement transformées (ni croissance en agar, ni multiplication multicouche, ni tumorigénicité). Certaines sont astrocytaires ; d'autres correspondent à des précurseurs bipotents oligodendrocyte-astrocytes. Plus récemment, nous avons immortalisé des précurseurs astrogliaux, des neuroblastes et des précurseurs pluripotents astrocyte-neurones. A l'aide des nouveaux vecteurs que nous avons construits et d'autres méthodes résumées ci-dessous (cf. § 2 et 5), nous étendons actuellement cette étude à des précurseurs issus du tube neural.

2. *Construction de vecteurs porteurs de gènes « immortalisants »*

Afin d'augmenter l'efficacité des transferts de gènes et de focaliser l'expression des séquences transférées, nous avons construit des vecteurs porteurs de gènes « immortalisants » placés sous contrôle de régions régulatrices à potentialité gliotrope ou neurotrope (issues du papovavirus JC et des séquences contrôlant l'expression des gènes codant pour la « Glial Fibrillary Acidic Protein » et les « Neurofilaments »). Nous avons aussi construit des vecteurs rétroviraux recombinants, porteurs de gènes immortalisants associés aux LTR du M.MuLV ou du Cas-Br-E-MuLV.

Nous avons également construit des vecteurs conduisant à des recombinaisons homologues et permettant de focaliser à la fois l'expression des gènes transférés et leur intégration dans le génome.

3. Vecteurs d'expression et marquage génétique

Avec des préoccupations et une démarche analogues à celles du § précédent (efficacité et « tropisme » des vecteurs), nous avons construit divers vecteurs associant le gène lacZ à des promoteurs « neurotropes », par exemple à la région régulatrice du gène NFL (codant pour la forme légère des neurofilaments) et, plus récemment, à la région enhancer du papovavirus JC et à des LTR rétroviraux. L'intégration et l'expression de ces vecteurs conduit à un marquage des cellules, permettant d'étudier leur différenciation *in vitro*, sous l'influence d'autres types cellulaires. L'obtention de lignées génétiquement marquées ouvre des perspectives d'étude concernant interactions, différenciation et prolifération, après transplantation chez l'animal de cellules marquées, primaires ou immortalisées ou encore transformées.

4. Différenciation, Interactions

— Parmi les lignées obtenues, certaines montrent des caractéristiques de précurseurs astrogliaux et sont capables de se différencier *in vitro*. L'étude de l'effet de facteurs de croissance (FGF, GMF- β , par exemple) sur cette différenciation est en cours. Nous avons observé, dans la plupart des cas, une corrélation entre le contrôle de la division cellulaire et la différenciation terminale.

— Plusieurs lignées présentent des propriétés de précurseurs bipotents oligodendrocyte-astrocyte. Après avoir délimité plusieurs étapes intervenant dans la différenciation de ces cellules, nous approfondissons l'étude de l'effet de facteurs de croissance (FGF, GMF- β , CNTF) sur l'engagement et la progression de ces cellules dans l'une ou l'autre voie de différenciation.

— D'autres lignées correspondent à des précurseurs pluripotents astrocyte-neurones. L'orientation de leur différenciation dépend des conditions de croissance. Nous avons entrepris d'examiner les relations entre l'expression de récepteurs à divers neurotransmetteurs, les interactions avec quelques facteurs de croissance (FGF, NGF, CNTF, HDNF, BDNF) et la différenciation de ces cellules.

Sur quelques-unes des lignées précédentes, nous avons commencé un travail concernant l'identification, l'expression et le clonage de gènes régulateurs impliqués dans le contrôle de la prolifération et dans la différenciation.

5. Systèmes transgéniques

Nous avons poursuivi notre collaboration avec F. Cuzin, relative à l'étude de souris transgéniques portant des séquences grand T du polyome. Ce travail a conduit à l'établissement de plusieurs types de lignées cellulaires. D'autre part, en relation avec les constructions de vecteurs résumées dans les § 2 et 3, nous avons entrepris d'établir des souris transgéniques, portant les gènes

grand T ou tsa, ou encore le gène lacZ, sous contrôle de « promoteurs » spécifiques de sous-populations de cellules nerveuses et précurseurs. Compte tenu des résultats obtenus, nous pouvons maintenant nous proposer d'élargir ce travail à l'établissement de lignées immortalisées de cellules précurseurs issues du tube neural et des crêtes neurales de diverses souris transgéniques portant le gène « grand T » ou tsa de polyome.

PUBLICATIONS

T. POPOVIVI, Y. BERWALD-NETTER, M. VIBERT, A. KAHN et H. SKALA, *Localization of aldolase C mRNA in brain cells (FEBS Lett., 268, 189-193, 1991).*

S. GAUTRON, P. MAIRE, V. HAKIM et A. KAHN, *Regulation of the multiple promoters of the human aldolase A gene : response of its two ubiquitous promoters to agents promoting cell proliferation (Nucl. Acids Res., 19, 767-774, 1991).*

Y. BERWALD-NETTER, D. PINTO-HENRIQUE, G. DOS SANTOS, A. KOULAKOFF, S. GAUTRON, F. GROS et M. NNODA, *Astrocytic glia and neurons express distinct molecular forms of the voltage-gated sodium channel (soumis, 1991).*

S. GAUTRON, G. DOS SANTOS, A. KOULAKOFF, D. PINTO-HENRIQUE et Y. BERWALD-NETTER, *The glial isoform of the sodium channel : a cellular and tissular analysis of mRNA expression (soumis, 1991).*

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 (Oncogene, 5, 1529-1533, 1990).*

J.C. LARCHER, J.L. VAYSSIÈRE, L. LOSSOUARN, F. GROS et B. CROIZAT, *Regulation of c- and N-myc expression during induced differentiation of murine neuroblastoma cells (Oncogene, 6, 633-638, 1991).*

L. CORDEAU-LOSSOUARN, J.L. VAYSSIÈRE, J.C. LARCHER, F. GROS et B. CROIZAT, *Mitochondrial maturation during neuronal differentiation in vivo and in vitro (Biol. Cell, 71, sous presse, 1991).*

J.L. VAYSSIÈRE, L. CORDEAU-LOSSOUARN, J.C. LARCHER, M. BASSEVILLE, F. GROS et B. CROIZAT, *Participation of the mitochondrial genome to the differentiation of a neuronal cell (soumis à Exp. Cell Res., 1991).*

S. BOYER, R. MAUNOURY, D. GOMES, B. DE NÉCHAUD, A.M. HILL et P. DUPOUEY, *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 central nervous system (*J. Neurosc. Res.*, 27, 55-64, 1990).

F. GUILLET, A. TOURNEFIER, P. DENOULET, J.P. CAPONY, F. KERFOURN et J. CHARLEMAGNE, *High levels of HMGI-2 protein expression in the cytoplasm and nucleus of hydrocortisone sensitive amphibian thymocytes* (*Biol. Cell*, 69, 153-160, 1990).

B. EDDÉ, J. ROSSIER, J.P. LE CAER, Y. BERWALD-NETTER, A. KOULAKOFF, F. GROS et P. DENOULET, *A combination of post-translational modifications is responsible for the production of neuronal alpha-tubulin heterogeneity* (*J. Cell. Biochem.*, 46, sous presse, 1991).

M. KAGHAD, X. DUMONT, P. CHALON, J.M. LELIAS, N. LAMANDÉ, M. LUCAS, M. LAZAR et D. CAPUT, *Nucleotide sequences of cDNAs for α and γ enolase mRNAs from mouse brain* (*Nucl. Acids Res.*, 18, 3638, 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.*, 27, 136-143, 1990).

D. WEIL, S. BROSSET et F. DAUTRY, *RNA processing is a limiting step for murine tumor necrosis factor β expression in response to interleukin-2* (*Mol. Cell. Biol.*, 10, 5865-5875, 1990).

G.L. FERRI, A. SABANI, L. ABELLI, J.M. POLAK, D. DAHL et M.M. PORTIER, *Neuronal intermediate filaments in rat dorsal root ganglia. Differential distribution of peripherin and neurofilament protein immunoreactivity and effect of capsaicin* (*Brain Res.*, 515, 331-335, 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 epithelium reconstituted in vitro* (*Arch. Oral Biol.*, 35, 217S-221S, 1990).

K. DJABALI, M.M. PORTIER, F. GROS, G. BLOBEL et S.D. GEORGATOS, *Network antibodies identify nuclear lamin B as a physiological attachment site for peripherin intermediate filaments* (*Cell*, 64, 109-121, 1991).

M. ESCURAT, K. DJABALI, C. HUC, F. LANDON, C. BECOURT, C. BOITARD, F. GROS et M.M. PORTIER, *Origin of the β cells of the islets of Langerhans is further questioned by the expression of neuronal intermediate filament proteins, peripherin and NF-L, in the rat insulinoma RIN 5F cell line* (*Dev. Neurosci.*, sous presse, 1991).

M.M. PORTIER, *Le cytosquelette neuronal : aspects structuraux, fonctionnels et dynamiques.* (*Revue Neurologique*, sous presse, 1991).

G. BRUNEAU, M.S. GROSS, M. KRIEGER, A. BERNHEIM, J. THIBAUT et V.C. NGUYEN, *Preparation of a human DOPA decarboxylase cDNA probe by PCR and its assignment to chromosome 7* (*Ann. Génét.* 33, 4, 208-213, 1990).

F. COGÉ, M. KRIEGER-POULLET, F. GROS et J. THIBAUT, *Comparative and quantitative study of L-DOPA decarboxylase mRNA in rat neuronal and non-neuronal tissues (Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 1006-1012, 1990).*

F. DE VITRY, J. HILLION, J. CATELON, J. THIBAUT, J. BENOLIEL et M. HAMON, *Dopamine increases the expression of tyrosine hydroxylase and aromatic amino acid decarboxylase in primary cultures of fetal neurons (Dev. Brain. Res., 59, 123-131, 1991).*

M. KRIEGER, F. COGÉ, F. GROS et J. THIBAUT, *Different mRNAs code for DOPA décarboxylase in tissues of neuronal and non-neuronal origin (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2161-2165, 1991).*

R. PERETTI-RENUCCI, C. FEUERSTEIN, M. MANIER, P. LORIMIER, M. SAVASTA, J. THIBAUT, N. MONS et M. GEFFARD, *Quantitative image analysis with densitometry for immunohistochemistry and autoradiography of receptor binding sites. Methodological considerations (J. Neurosci. Res., 28, 583-600, 1991).*

R. RAISMAN-VOZARI, E. HIRSCH, F. JAVOY-AGID, C. VASSORT, M. SAVASTA, C. FEUERSTEIN, J. THIBAUT et Y. AGID, *Quantitative autoradiography of tyrosine hydroxylase. Immunoreactivity in the rat brain (J. Neurochem., sous presse, 1991).*

E. GALIANA, I. BORDE, P. MARIN, M. RASSOUZADEGAN, 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., 26, 269-277, 1990).*

C. LUBETZKI, C. GOUGET-ZALC, C. EVRARD, O. DANOS, P. ROUGET et B. ZALC, *Gene transfer of rat mature oligodendrocytes and glial progenitor cells with the lacZ gene (Ann. N.Y. Acad. Sci., 605, 66-70, 1990).*

C. EVRARD, M. LE BERT, I. BORDE, E. GALIANA, R. BERNARD et P. ROUGET, *Transfert de gènes dans les cellules nerveuses. Immobilisation cellulaire et marquage génétique (Méd. Sci., 4, 9-12, 1991).*

P. ROQUES et M. OLOMUCKI, *Chorotetrolic acid ester as a structural probe of RNA (Nucleos. Nucleot., 9, 455-456, 1990).*

P. CLAYETTE, Y. MERROUCHE, T. GHARBAOUI, P. ROQUES, R. BEUGELMANS, M. OLOMUCKI et D. DORMONT, *Activité anti-VIH de nouveaux dérivés nucléosidiques : les acyclonucléosides et les nucléosides à base tricyclique (C.R. Serv. Santé Armées, 11, 59-60, 1990).*

P. CLAYETTE, Y. MERROUCHE, T. GHARBAOUI, P. ROQUES, R. BEUGELMANS, M. OLOMUCKI et D. DORMONT, *Anti-HIV activities of novel nucleoside analogs : acyclic and tricyclic base nucleosides (Antivir. Chem. Chemother., sous presse, 1991).*

M. OLOMUCKI, *La chimie du vivant (Paris, éd. Hachette, 1991).*

THÈSE DE DOCTORAT

F. COGÉ, « *Etude de la L-DOPA-décarboxylase (E.C. 4.1.1.28) du rat : la protéine, son ARN messenger, son expression dans divers tissus* », octobre 1990 (Université Paris XII).

J.C. LARCHER, « *Aspects cellulaires et biochimiques de la neurogénèse - Etude des oncogènes nucléaires* », décembre 1990 (Université Pierre et Marie Curie).

L. CORDEAU-LOSSOUARN, « *Etude de la maturation mitochondriale au cours de la différenciation neuronale* », mars 1991 (Université Paris VII).

K. DJABALI, « *Dynamiques et interactions spécifiques de la périphérine, protéine de filament intermédiaire neuronale* », juillet 1991 (Université Paris VII).

DIPLOMÉS D'ÉTUDES APPROFONDIES

S. BROSSET, *Analyse structurale du gène de la sous-unité β de l'énolase murine. Génétique humaine*, septembre 1990 (Université Paris VII).

CONFÉRENCES, INVITATIONS, PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS

Au cours de l'année, le Professeur F. GROS a donné une série de conférences sur la myogénèse ou la neurogénèse dans diverses Universités ou Instituts étrangers. Ex : au laboratoire du Professeur Jaenicke, Département de Biophysique à Regensburg (RFA), à l'occasion du Colloque international sur les maladies neuromusculaires (Munich), à l'Université de Tsukuba (Japon), à l'Université de Konstanz sur l'invitation du Professeur Dirk Pette ; à l'Université de Genève (professeur R. Weil)...

Une conférence intitulée : *Bases moléculaires des maladies génétiques* a été prononcée au Collège de France, à la demande du CAES.

Enfin, une conférence intitulée *Gene therapy and neuro-muscular diseases* a été donnée à Londres sur invitation et dans le cadre de la Royal Society.

M^{me} Y. BERWALD-NETTER a été invitée à un Colloque sur « les canaux ioniques », Carry le Rouet (Bouches-du-Rhône, 1990), où elle a présenté une communication : *Les isoformes des canaux sodiques voltage-dépendants des cellules du SNC : spécificité cellulaire et développement*. Elle a été invitée à

présenter un séminaire : *Les canaux sodiques voltage-dépendants des cellules neuronales et gliales ; étude pharmacologique et moléculaire*. Institut d'Embryologie (Nogent-sur-Marne, 1991).

M^{me} Y. BERWALD-NETTER, M. G. DOS SANTOS, M^{me} S. GAUTRON, M^{me} A. KOULAKOFF et M. D. PINTO-HENRIQUE ont présenté une communication affichée : *Astrocytic glia and neurons express distinct forms of voltage-gated Na channels*, Workshop sw « Glial-Neuronal Interaction » (Cambridge, Angleterre, 1990).

M^{me} A. KOULAKOFF a été invitée à donner un séminaire : *Etude de l'expression des canaux Na voltage-dépendants dans les cellules du système nerveux*. INSERM U114, Collège de France (Paris, 1991). Elle a donné une conférence : *Développement des canaux ioniques*, dans le cadre du DEA de Physiologie du Développement (Université Paris VI, 1991).

M. B. CROIZAT a donné un séminaire : *Effects of glutamate on primary cultures of cortical neurons*. Pfizer Central Research (Groton, Conn. USA, 1990).

M. J.C. LARCHER a présenté une communication : *Thermosensitive conditional cellular immortalization : phenotypic alterations induced at the restrictive temperature and genetic complementation* EMBL Conference : Oncogenes and Growth Control. (Heidelberg, RFA, 1990).

M. Ph. DENOULET a été invité à donner quatre conférences : 1) *Tubulines et différenciation neuronale*, D.E.A. de Physiologie du Développement, Paris VI (17/12/90), 2) *Les moteurs protéiniques des microtubules : Transport axonal vectorisé des vésicules et des organites*, D.E.A. de Biochimie, Paris VI (23/02/91), 3) *Polymorphisme des protéines microtubulaires*, Service Hospitalier Frédéric Joliot, C.E.A., Orsay (18/03/91) et 4) *Le polymorphisme des tubulines au cours de la différenciation neuronale*, Conférences Associées au cours du Pr. J.P. Changeux, Collège de France, Paris (27/05/91).

M. B. EDDÉ et M. P. DENOULET ont participé au Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on The Role of Isoform Diversity in Cytoskeletal Functions (Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.) (04/91) où ils ont présenté une communication : *Neuronal tyrosinated alpha-tubulin is mostly poly-glutamylated*.

M^{me} B. de NÉCHAUD a été invitée au Medical Research Center de Varsovie (Pologne) (05/91) où elle a donné une conférence : *Tubulin polymorphism of the neuronal cytoskeleton*.

M^{lle} M. LUCAS, M^{me} A. KELLER, M^{me} C. GOBLET, M.N. LAMANDÉ et M^{me} M. LAZAR ont présenté une communication affichée : *Regulation of the expression of the gene encoding the striated muscle specific $\beta\beta$ isoform of enolase*. XIXth European Conference on Muscle Contraction and Cell Motility. Bruxelles. Abstr. B28. (1990).

M^{lle} M. LUCAS, M^{me} A. KELLER, M. N. LAMANDÉ, M. F. GROS et M^{me} M. LAZAR ont présenté une communication affichée : *Developmental expression of muscle-specific β enolase*, au 16th EMBO Annual Symposium of the Molecular Biology of Vertebrate Development (Heidelberg, 1990).

M^{me} M. LAZAR a participé à la Conférence Jacques Monod : *Cell interactions and cell differentiation* (Toulon, 1990). Elle a été invitée à donner une conférence : *Enolase gene expression in muscle and nerve*, Symposium on the Control of Gene Expression of the Regional Meeting of the International Society of Physiology (Prague, 1991).

M^{me} A. KELLER, M^{lle} M. LUCAS, M. N. LAMANDÉ, M^{lle} S. BROSSET, M. F. GROS et M^{me} M. LAZAR ont présenté une communication affichée : *L'énolase β , marqueur précoce de la myogénèse chez la souris*, au 4^e Colloque National sur les Maladies Neuro-musculaires (Montpellier, 1991).

M^{me} A. KELLER, M^{lle} M. LUCAS, M. N. LAMANDÉ, M. O. OTT, M. F. GROS et M^{me} M. LAZAR ont présenté une communication : *Early expression of muscle-specific enolase during mouse development*. Abstr. n° 39. European Developmental Biology Congress (Jerusalem, 1991).

M^{me} M. LAZAR, M^{me} A. KELLER, M^{lle} M. LUCAS, M. N. LAMANDÉ, M^{lle} S. BROSSET, M. D. BUTLER et M. F. GROS ont présenté une communication affichée : *β enolase is an early marker of myogenesis in the mouse*. Keystone Symposia Conference on Gene Expression in Neuromuscular Development (U.S.A), Supplement 15C, Abstr. F120 (1991).

M^{me} M.M. PORTIER a présenté trois séminaires : 1) *Meaning of the co-expression of peripherin and neurofilament proteins* (EMBL, Heidelberg, Allemagne ; septembre 1990) ; 2) *Attachment of peripherin, a neuronal intermediate filament, to lamin B* (New York University Medical Center, Department of Biochemistry ; novembre 1990) ; 3) *Role of the peripherin network in neurons ?* (Institut de Recherches de l'Hôpital Général de Montreal, Canada ; novembre 1990). Elle a participé au 20th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Saint Louis, USA ; octobre 1990) où elle a présenté une communication : *A neuronal intermediate filament protein, peripherin, is expressed in the rat insulinoma cell line*.

M^{lle} K. DJABALI a présenté quatre séminaires : trois avaient pour titre : *Network antibodies identify nuclear lamin B as a physiological attachment site for peripherin intermediate filaments* (Cornell University Medical College, Cell Biology and Genetics, décembre 1990 ; The Rockefeller University, Cell Biology, décembre 1990 ; Klinikum der Philipps-Universität Marburg, Institut für Virologie, février 1991) ; le quatrième : *Dynamique et interactions spécifiques de la péripérine, protéine de filament intermédiaire neuronale*, a été donné en France (Hôpital de la Salpêtrière, Laboratoire de Neuropathologie, R. Escourrolle, Paris, mai 1991).

M^{lle} F. GOSSELIN a participé au Forum pour Jeunes Chercheurs en Odontologie (Lyon, octobre 1990) où elle a présenté une communication : *Utilisation des cytotokératines comme marqueurs moléculaires de la différenciation d'épithéliums gingivaux reconstitués in vitro.*

M. M. ESCURAT a présenté une communication : *Contrôle épigénétique de l'expression de la périphérine, protéine de filament intermédiaire neuronale* au IV^e Colloque National de l'Association Française contre les Myopathies sur les Maladies Neuromusculaires (Montpellier, juin 1991).

M^{me} C. EVRARD a été invitée au 2^e Colloque de la Société de Pharmacotoxicologie Cellulaire où elle a présenté une communication : *Lignées immortalisées de cellules nerveuses* (Paris, mars 1991).

M. P. ROUGET a été invité à deux colloques, où il a présenté deux communications : 1) *Immortalization and genetic labelling of different types of neural cells. Differentiation of the lines and expression of neurotransmitter receptors*, 38th Annual Meeting of the European Tissue Culture Society (Londres, septembre 90) ; 2) *Transfert de gènes in vitro. Immortalisation et marquage génétique.* 2^e Colloque de la Société de Pharmacotoxicologie Cellulaire (Paris, mars 1991).

DISTINCTIONS

Le Professeur F. GROS a été nommé Membre associé étranger de « L'Indian National Academy of Sciences » et a reçu la grande plaque en or de la Société des Arts, des Sciences et des Lettres.