

## Biochimie cellulaire

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

L'étude des maladies génétiques est entrée dans une phase très active depuis l'utilisation des techniques de l'ADN recombinant et la mise en œuvre de procédés originaux conduisant à la caractérisation plus aisée des mutations, ainsi qu'à la localisation chromosomique du gène qui en est affecté. Il s'agit donc là d'un chapitre nouveau de la pathologie humaine dont on est en droit de penser qu'il ouvre des perspectives considérables à une médecine qu'on pourrait qualifier de « prédictive ». Ces progrès très importants s'inscrivent en droite ligne de ceux qu'a connus, ces dernières années, la génétique humaine et, plus spécialement, ce que Victor A. McKusick a appelé « l'anatomie morbide du génome humain ». On entend par là l'établissement systématique des cartes chromosomiques humaines fondé sur la recherche, puis la localisation de mutations monogéniques conduisant à l'apparition d'un phénotype morbide.

Notre cours a donc commencé par un rappel des principales connaissances acquises au cours de ces dernières années sur la carte génétique de l'homme et notamment sur les techniques récentes qui en facilitent l'établissement.

On sait que les chromosomes furent décrits en 1877 par Walther Flemming, un biologiste allemand qui devait fournir dès 1882 les premières images de chromosomes humains. Les premières preuves en faveur du rôle de ces chromosomes en tant que supports physiques de l'hérédité furent apportées par E.B. Wilson en 1896, mais c'est Walter S. Sutton qui émit le premier l'hypothèse en 1902 selon laquelle les chromosomes contiennent les « facteurs » auxquels Gregor Mendel dans sa fameuse théorie sur la transmission héréditaire avait assigné, en 1805, le rôle de « particules de l'hérédité » (le terme de « gène » n'ayant été proposé que vers 1910 par Johanssen). On sait que l'École de T.H. Morgan allait développer par la suite (1911) les techniques, et développer les concepts (groupe de « liaison ») qui permirent de déterminer, l'arrangement *linéaire* relatif des gènes sur les chromosomes.

Le premier « gène » qui fut localisé sur un chromosome humain fut celui responsable (après mutation) de la cécité aux couleurs. Ce fut là l'œuvre de E.B. Wilson (1911) qui « assigna » la mutation au chromosome X. Dans les 5 à 6 décennies qui suivirent, d'autres mutations purent être localisées sur ce même chromosome (ex : hémophilie, myopathie de Duchenne), alors que la première identification de l'emplacement d'un gène sur un « autosome » (chromosome non sexuel) le fut grâce aux travaux de Donahue (1968) ; il s'agissait de la mutation « Duffy » liée à un hétéromorphisme du chr. 001. La topographie génétique allait connaître une importante avancée après l'introduction dans les années 1970, des techniques d'hybridation somatique cellulaire (approche qualifiée de « para-sexuelle » par Pontecorvo).

Dans l'intervalle, des chercheurs comme Penrose, Mohr, C.A.B. Smith ou N.E. Morton avaient raffiné l'étude des groupes de liaison et défini la technique du Lod score pour introduire des bases quantitatives.

C'est également dans les années 1970 que l'on a commencé à attirer l'attention sur l'étude des « liaisons génétiques » (linkage en anglais) pour faciliter le diagnostic prénatal de certaines maladies génétiques (ex : liaison découverte entre une mutation au locus G6PD et l'hémophilie classique, étudiée par McCurdy en 1971).

En Juin 1976, on pouvait admettre que la combinaison des techniques SCH (somatic cell hybridization) et FLS (family linkage study) avait permis d'assigner au moins un gène par chromosome humain (22 autosomes + les 2 chromosomes sexuels).

A peu près à la même époque apparaîtront les techniques de cytogénétique (banding patterns) sous l'instigation de Caspersson et la localisation des « bandes » chromosomiques (près de 400 en 1976) contribuera beaucoup à la cartographie du génome humain (Francke, Yunis). Mais il est clair qu'une véritable révolution dans la localisation des mutations génétiques de l'homme a résulté de l'essor des techniques de l'ADN recombinant, de l'emploi des enzymes de restriction, ainsi que des méthodes d'hybridation moléculaire sur gel (année 1975).

Les premières banques (« librairies ») de fragments d'ADN clonés en provenance de chromosomes humains sont alors établies.

Ce sera ensuite l'introduction des techniques fondées sur la reconnaissance d'un très grand degré de polymorphisme moléculaire chez l'homme, qui permet d'établir l'étude de la sensibilité des chromosomes aux enzymes de restriction (restriction fragment length polymorphism ou RFLP), le premier cas signalé étant celui d'une mutation RFLP à l'enzyme HpaI au voisinage du gène de la  $\beta$ -globine humaine. En 1983, utilisant les techniques de liaison aux marqueurs RFLP, Grisella et coll. parviennent à localiser la région du chro-

mosome porteuse de la mutation responsable de la maladie de Huntington (sorte de chorée dégénérative) tandis que Reeders et coll. (1985) font de même pour le syndrome polykystique rénal.

Plus récemment enfin, d'autres approches méthodologiques ont vu le jour : hybridation *in situ* qui permet de localiser *directement*, grâce à des sondes radioactives, une mutation au voisinage d'une bande chromosomique définie ; clonage de fragments d'ADN de plusieurs dizaines de Kd dans des cosmides, ou de quelques centaines de Kb dans des chromosomes de levure (technique des chromosomes artificiels de levure, yeast artificial chromosomes ou YAC's) etc.

En 1987, selon McKusick, au moins 1 215 gènes avaient été localisés en des régions définies des chromosomes, 365 de ces gènes étant connus comme porteurs de mutations entraînant des maladies héréditaires, le nombre total de *loci* identifiés étant de 4 261. On peut dire qu'aujourd'hui plus de 3 000 gènes humains sont localisés et que l'on a décrit plus de 2 000 mutations à l'origine de maladies neurogéniques.

Les deux cours suivants ont été consacrés à une illustration des données relatives à une catégorie *particulière* de maladies génétiques humaines dénommées « myopathies ». Il s'agit de maladies neuromusculaires résultant d'une mutation monogénique apparaissant soit dans le chromosome X, soit dans un autosome, soit dans l'ADN mitochondrial et se caractérisant par un défaut dans le développement ou le fonctionnement de la fibre musculaire striée proprement dite (squelettique ou cardiaque), ou par un défaut de caractère « neurogène » (corne antérieure de la moelle, motoneurone, plaque motrice, etc.). La première maladie musculaire type fut décrite par le docteur Duchenne dans les années 1860, sous la forme d'une myopathie dégénérative progressive atteignant le plus souvent les enfants mâles et causant dans la première adolescence une paralysie des membres inférieurs, suivie ultérieurement par une paralysie des muscles respiratoires, des syndromes cardiopathiques et neuropathiques. Cette maladie est létale et affecte en moyenne 1 garçon sur 3 500. Depuis les travaux de Duchenne, une multitude de types de maladies musculaires a été décrite. On connaît aujourd'hui environ 40 à 50 formes de myopathies, que le cours passe en revue :

- Myopathies progressives, type Duchenne ou sa forme atténuée (Becker).
- Myopathies congénitales, qui, contrairement aux précédentes, sont manifestées dès la naissance.
- Myopathies tubulaires (avec dépôts amyloïdes ou inclusions cytologiques).
- Myotonies, affectant diverses formes de canaux ioniques (ex : myotonies de Steinert).

— Myopathies métaboliques, liées à des mutations d'enzymes de la glycogénolyse ou du métabolisme des acides gras (glycogénoses, lipidoses) et incluant le très important groupe des maladies mitochondriales (ex : myopathies de McArdle).

— Amyotrophies spinales infantiles ou myopathies neurogènes, généralement très graves.

— Myasthénies, ou maladies résultant d'un syndrome auto-immun, entraînant un blocage du récepteur cholinergique à la jonction neuromusculaire.

— Myosites, maladies des muscles d'origine inflammatoire, etc.

Les principales manifestations physiologiques de ces maladies sont décrites en insistant sur les connaissances en matière de localisation génétique des mutations correspondantes.

Un développement spécial est consacré aux données moléculaires relatives à la myopathie de Duchenne (Duchenne muscular dystrophy ou DMD) et à sa forme atténuée (BMD : Becker muscular dystrophy).

L'approche de la génétique inverse (c'est ainsi que l'on dénomme aujourd'hui, l'ensemble des procédés qui, partant de la connaissance d'une transmission familiale d'un trait mutationnel morbide, conduit à sa localisation globale par la technique FLS, puis à une localisation plus précise (technique RFLP) et finalement au clonage du gène porteur de la mutation), a permis de localiser le gène porteur des altérations à l'origine de la DMD. Le gène DMD a pu être localisé (Kunkel et Monaco ; Olson ...) en Xp21 sur le bras court du chromosome X. Il s'agit du plus grand des gènes jamais décrit (plus de 2 millions de paires de bases). Il code pour une protéine, la dystrophine, de 420 kilodaltons, sorte de molécule fibrillaire à localisation sarcolemmale, qui comprend un domaine N-terminal voisin de l' $\alpha$  actinine, un domaine central formé de 21 triple hélices, un autre domaine analogue à l' $\alpha$  actinine, et une extrémité C-terminale dont la séquence est caractéristique de la protéine considérée. La dystrophine est reliée à la membrane par une série de glycoprotéines décrites par Campbell (1989). La myopathie de type DMD (grave) est due, dans près de 70 % des cas, à l'existence de délétions qui provoquent un changement du cadre de lecture, abolissant pratiquement toute synthèse de la protéine. Dans la forme atténuée (BMD), les délétions sont compatibles avec le maintien d'un cadre de lecture, de sorte que persistent chez le malade des fragments plus ou moins importants de dystrophine qui suffisent à *stabiliser* la membrane plasmique du muscle.

Le gène lié au chromosome X a fait l'objet d'études particulièrement poussées : il comprend plus de 60 exons et probablement 3 promoteurs. Deux d'entre eux (position 5') sont responsables : de l'expression du gène dans le système nerveux (la dystrophine est alors présente aux jonctions neuromuscu-

lares), pour le promoteur le plus distal, (D. Yaffe, A. Kahn, J.C. Kaplan, Y. Netter) ou, s'agissant du promoteur plus proximal, de son expression dans le muscle squelettique. Un troisième promoteur, beaucoup plus proche de l'extrémité C-terminale, contrôle la formation d'un court fragment de dystrophine, dont le rôle physiologique demeure inconnu (D. Yaffe). A noter que l'expression du gène DMD dans les cellules gliales fait intervenir le promoteur de type « musculaire ».

Le cours passe en revue les propriétés des différents « transcrits » et des isoformes, résultant de l'utilisation de ces divers promoteurs. Un gène codant pour la dystrophine, mais de localisation autosomique cette fois (chromosome : n° 6), a été décrit par Kay Davies en Grande-Bretagne ; il code pour une protéine apparentée à la dystrophine (dystrophin related protein ou DRP) dont le rôle n'est pas encore établi.

En conclusion de la série des cours donnés à Paris, on passe en revue les principales maladies neuromusculaires (plus d'une douzaine) dont les mutations ont pu être localisées sur les chromosomes par la méthode de la génétique inverse, certains des gènes impliqués ayant parfois été clonés.

Une partie des cours a également eu lieu cette année à l'Université de Montpellier I, sur invitation du Professeur Philippe Jeanteur (3 heures de cours au total). Ces cours ont comporté :

1) D'une part, une récapitulation des 6 heures de cours donnés à Paris sur les bases moléculaires des maladies neuromusculaires.

2) D'autre part, un développement sur le thème des « thérapies géniques ». Cette nouvelle approche, dernier-née des techniques de l'ADN reverse et de la transformation génétique, consiste à introduire artificiellement dans les cellules somatiques d'un animal ou d'un patient atteint d'une maladie génétique grave, un gène fonctionnel, normal, et à injecter à nouveau les cellules ainsi modifiées chez l'animal de laboratoire ou chez l'homme. Le but est, à l'évidence, de corriger par compensation ou par substitution (recombinaison homologue) le défaut génétique majeur de l'animal hôte ou du patient. De très nombreuses techniques permettent aujourd'hui : soit le transfert *ex vivo* du gène correcteur dans des cellules somatiques prélevées chez l'animal atteint ou chez un patient, en utilisant comme « vecteurs » des rétro-virus rendus inoffensifs par délétion des gènes d'encapsidation, soit le transfert direct à l'animal entier, à l'aide de vecteurs adéno-viraux, d'incidence physiologique bénigne et qui peuvent véhiculer le gène nouveau dans divers tissus (le plus souvent respiratoires) soit, enfin, le transfert direct à l'animal par injection intra-musculaire du gène utilisé (technique de Jon Wolffe). Ces constructions une fois transférées permettent en général au gène ainsi véhiculé, de s'exprimer à un taux très élevé dans le tissu, avec, le plus souvent, une atténuation très marquée des symptômes associés à la maladie génétique (ex : restauration

de synthèse de l' $\alpha_2$  antitrypsine chez des rats porteurs d'une mutation affectant cette enzyme ; restauration du canal chlore dans les cellules de patients atteints de mucoviscidose après transformation *ex vivo* ; guérison de rats atteints d'une mutation affectant l'UDP glucose transférase, etc.). Récemment (1989) les premiers essais thérapeutiques chez l'humain ont été autorisés aux Etats-Unis : les deux protocoles les mieux connus concernent :

a) le traitement des mélanomes aigus par ré-injection aux patients de lymphocytes infiltrants autologues (TIL), après avoir modifié ces lymphocytes *in vitro* en incorporant le gène codant pour le facteur de nécrose tumorale, ou TNF (ex : de S. Rosenberg et coll.) ;

b) le traitement du déficit lymphocytaire en adénosine déaminase (ADA), situation très grave puisque ce déficit s'accompagne de la mort des lymphocytes, donc de la perte du système immuno-compétent. L'essai a consisté dans la réintroduction artificielle du gène ADA dans des cellules souches de moelle prélevées chez des enfants atteints. Certaines guérisons avaient été observées. D'autres protocoles visant au traitement de l'hypercholestérolémie homozygote, ou du cancer du col, sont également en cours de développement. L'utilisation de la thérapie génique somatique trace donc des perspectives très importantes à la médecine d'aujourd'hui. Elle n'est pas, cependant, sans poser des problèmes éthiques (détournement possible de son objectif proprement médical pour des interventions de convenance ; essais de transfert génique dans les gamètes, etc.) qui ont été évoqués dans ce cours.

F. G.

#### SÉMINAIRES

(à Montpellier, Université Montpellier II, dans le cadre des cours de François GROS) :

P. BERTA (Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, Montpellier), *Mécanismes moléculaires de la détermination du sexe chez l'homme et pathologies associées.*

M. PIECHACZYK (Génétique Moléculaire, Montpellier), *Ciblage cellulaire par les rétrovirus recombinants.*

(au Collège de France) :

K. SCHERRER (Institut Jacques Monod, Université Paris VII), *Les Pro-somes : différenciation cellulaire et pathologie d'un nouveau système de facteurs intra- et extracellulaires.*

J.L. MANDEL (Institut de Chimie Biologique, LGME, Strasbourg), *Approche de deux maladies génétiques neurodégénératives : l'ataxie de Friedreich et l'adrénoleucodystrophie.*

J.C. KAPLAN (Biochimie Génétique, Groupe Hospitalier Cochin), *La transcription illégitime : principe et application au diagnostic des mutations.*

#### PROFESSEURS INVITÉS

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

M. BENNO HESS (Professeur au Max-Planck-Institut de Heidelberg) :  
1. *Principles of molecular selforganization : on the dynamic anatomy of chemical and biological spirals.* 2. *Reflections on the concept of order and chaos in time and space.*

M. JOZEF S. SCHELL (Directeur du Département de Génétique des plantes ; Max-Planck-Institute, Cologne) : 1. *Génie-génétique des plantes en tant que « phénomène naturel ».* 2. *Structures et fonctions des oncogènes végétaux portés par les plasmides Ti et Ri des bactéries phytopathogènes acrobacterium tumefaciens et rhizogenes.* 3. *Le contrôle de la croissance et de la différenciation végétale.* 4. *Agriculture intensive et protection de l'environnement : impact possible de la biologie moléculaire.*

M. EDWARD B. ZIFF (Professeur de Biochimie à Howard Hughes Medical Institute ; New York, USA) : 1. *Expression of the early response genes.* 2. *Induction of differentiation by nerve growth factor.* 3. *Myc and nuclear protein second messengers.* 4. *Transformation and the loss of cell cycle control.*

M. PUSHPA M. BHARGAVA (Directeur de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire ; Hyderabad, Inde) : 1. *The biochemical and molecular biological uniqueness of spermatozoa.* 2 et 3. *Seminalplasmin, a protein from bovine seminal plasma that may be involved in regulation of fertility and of HIV infection.* 4. *Unusual proteins of seminalplasma, including proteases and the control of protein stability.*

D'autres professeurs ont donné un séminaire au laboratoire :

J. TROJAN (Laboratory of Developmental Genetics and Molecular Biology ; Case Western reserve University, Cleveland, USA) : *Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by episome-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor one.*

E.B. LANE (Department of Biochemistry, Medical Sciences Institute, The University of Dundee) : *How keratins hold us together.*

J. ILAN (Unit of Developmental Genetics and Molecular Biology ; School of Medicine, Cleveland, Ohio, USA) : *Specific regulation of transcription by translational components in a coupled eukariotic cell-free system.*

J.F. LETERRIER (CHRU, Angers) : *Des interactions faibles entre les neurofilaments sont-elles critiques pour le maintien de la fluidité axoplasmique ?*

J.A. COHLBERG (California State University) : *Soluble heterooligomers suggest a model for neurofilament assembly.*

V. PRASSOLOV (Institute of Molecular Biology ; Russian Academy of Sciences) : *Retroviral vectors - An effective system for transfer and expression of genes in mammalian cells.*

N. STERNBERG (Du Pont Merck Pharmaceutical Company) : *A bacteriophage p1 system for the cloning of high molecular weight (> 80 Kb) genome DNA.*

E. KORDELI (Howard Hughes Medical Institute, Durnam, NC, USA) : *Molecular dissection of neuronal membrane skeletons.*

C. RODRIGUES-POUSADA (Institut Gulbenkian de Ciencia, Oeiras, Portugal) : *Tetrahymena - Modele d'étude de la biogenèse des microtubules ciliaires.*

P.H. PATTERSON (California Institute of Technology ; Division of Biology) : *Surface and cytoskeletal proteins that mark position in mammalian nervous system.*

O. PONGS (Zentrum für Molekulare Neurobiologie, University Hambourg) : *Structural and functional analysis of voltage-gated K-channels in the nervous system.*

#### ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

*Analyse moléculaire d'une nouvelle isoforme du canal Na voltage-dépendant : Le canal Na-G*

(Y. BERWALD-NETTER, C. ANDRÉ, G. DOS SANTOS, S. GAUTRON E. HOUZET, A. KOULAKOFF, B. LESAFFRE)

Dans le cadre de nos études sur la spécificité cellulaire et la régulation de l'expression des isoformes cérébrales du canal Na voltage-dépendant (voir annuaire collège 1990), nous avons mis en évidence une nouvelle isoforme, appelée Na-G, dont l'expression dans le système nerveux central est spécifique des cellules astrogliales. Au cours des deux dernières années, nous nous sommes attachés à définir la structure moléculaire de cette isoforme et à en analyser la distribution tissulaire et cellulaire.

Une banque d'ADNc a été préparée à partir d'ARN poly A+ extraits d'astrocytes de rat en culture. Le criblage initial avec une sonde nucléotidique correspondant à une séquence codante hautement conservée dans les autres isoformes cérébrales du canal Na, a conduit à l'isolement de clones recouvrant

la partie 3' de Na-G. Des criblages supplémentaires à l'aide de sondes en 5' de la séquence gliale, ont permis d'obtenir de proche en proche la copie complète de l'ADNc Na-G.

La comparaison de la structure primaire de Na-G avec celle des isoformes cérébrales et musculaires du canal Na révèle une organisation très similaire : 4 domaines homologues, chacun comprenant des segments hydrophobes (S1-S6), présumés transmembranaires, séparés par des segments hydrophiles. L'analyse des séquences a montré une disparité régionale considérable dans le degré d'homologie : tandis que l'homologie moyenne pour la séquence globale est de  $\approx 55\%$ , au niveau des segments individuels, elle peut varier de 35 à  $> 90\%$ . Un degré remarquable d'homologie entre Na-G et les autres isoformes du canal Na est trouvé dans les séquences reliant les segments S5 à S6 qui contribuent à la formation des parois du canal. Des travaux récents de mutagenèse dirigée couplée à des essais fonctionnels (Stühmer et coll.) ont permis d'assigner à cette région des résidus impliqués dans la sensibilité des canaux Na au blocage par la tétrodothoxine et/ou la saxitoxine. Seulement certains de ces résidus sont présents dans le canal Na-G, ce qui concorde avec la faible sensibilité à la tétrodothoxine des canaux Na des cellules astrogliales, démontrée précédemment par des essais pharmacologiques. De manière inattendue, les segments S4 qui forment l'élément voltage-sensible du canal sont relativement peu conservés ( $\approx 35\%$ ) dans Na-G. Ils sont néanmoins dotés du motif caractéristique des S4 — acides aminés à charge positive alternant de manière périodique avec des acides aminés neutres.

Afin de déterminer la distribution cellulaire et l'abondance des ARNm Na-G, des sondes nucléotidiques spécifiques ont été produites. Leur emploi dans des expériences d'hybridation moléculaire (Northern blot, RNase protection, hybridation *in situ*) a montré que les ARNm Na-G ne sont pas restreints aux cellules astrogliales. En effet, ces sondes hybrident à haute stringence avec des ARNm issus de cellules gliales périphériques - les cellules de Schwann. Comme dans les cellules astrogliales, Na-G représente l'isoforme majoritaire sinon exclusive de canal Na décelable dans ces cellules.

En dehors du tissu nerveux, la présence des ARNm Na-G a été mise en évidence dans le muscle cardiaque et le muscle squelettique. Le profil d'accumulation des ARNm Na-G au cours de l'ontogenèse dans ces deux tissus est réminiscent de celui décrit pour les canaux Na tétrodothoxine-insensibles : alors que dans le muscle cardiaque, on observe une accumulation progressive pour atteindre un taux maximal chez l'adulte, leur expression dans le muscle squelettique est transitoire (périnatale). Lors de la dénervation du muscle squelettique adulte, une induction du mRNA Na-G est observée. Il apparaît donc que le canal Na-G appartient à la catégorie des canaux Na peu sensibles à l'effet bloquant de la tétrodothoxine.

L'ensemble des données obtenues démontre que Na-G est une nouvelle espèce de canal Na voltage-dépendant et vraisemblablement représente le premier membre d'une nouvelle classe moléculaire à l'intérieur de la famille multigénique des canaux Na voltage-dépendants.

*Etude de la neurogenèse ; neurotoxicité, expression du génome mitochondrial. Etude du motoneurone*

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

1. *Neurotoxicité du glutamate sur les cultures primaires de neurones corticaux*

Il est établi que le glutamate, acide aminé excitateur qui participe normalement à la signalisation du système nerveux central, peut agir comme un neurotoxique en induisant un excès de calcium intracellulaire. Cette neurotoxicité peut provoquer des effets pathologiques aussi bien au cours d'attaques au niveau du cerveau que dans des maladies dégénératives progressives.

Il était intéressant d'analyser les effets du glutamate sur nos cultures de neurones corticaux afin d'examiner certains mécanismes cellulaires impliqués dans la neurotoxicité. Nous avons constaté qu'une étape précoce était la suppression de la transmission synaptique. Cet effet s'accompagne de modifications de la cytoarchitecture (neurofilaments et vésicules synaptiques). Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise à *Neurosciences Letters*.

2. *Expression du génome mitochondrial*

J.L. Vayssière, actuellement en stage au Centre de Génétique Moléculaire de Gif-sur-Yvette, continue son travail sur l'activité génétique de la mitochondrie.

Il utilise une cellule embryonnaire de rat immortalisée de façon thermo conditionnelle par un allèle thermosensible du gène LT de SV40. Il a pu montrer que l'état sénescence thermoinduit pourrait être associé à une altération de la fonction mitochondriale, accompagné d'un défaut de l'expression des protéines chaperones de la famille h.s.p.70. Ces protéines sont impliquées dans la biogenèse mitochondriale.

3. *Étude du motoneurone et contribution à l'étude du phénotype moléculaire correspondant à la pathologie amyotrophie spinale (AMS)*

L'objectif est de :

- repérer des marqueurs spécifiques du motoneurone ;

- étudier les interactions du motoneurone avec les cibles cellulaires et repérer des protéines altérées.

On procède à l'analyse comparative en électrophorèse bidimensionnelle des extraits de moelle épinière et de muscle de témoin et de patients AMS. Les protéines connues sont repérées sur les électrophorogrammes par immunoblotting à l'aide d'anticorps monoclonaux.

Nos résultats préliminaires révèlent la présence dans la moelle épinière AMS de trois protéines d'environ 25kDa et d'une protéine de 35kDa absentes chez le témoin. Dans le muscle AMS, on observe une diminution dans l'expression de trois protéines d'environ 20kDa ; deux protéines de 25kDa et 30kDa respectivement, ne sont pas exprimées.

Nous suivons l'évolution de ces protéines neuronales et musculaires au cours de l'ontogenèse et procéderons au microséquençage de certaines d'entre elles.

#### *Expression des protéines microtubulaires*

(P. DENOULET, S. AUDEBERT, D. BOUCHER, D. CHILLET, B. DE NÉCHAUD, E. DESBRUYÈRES, B. EDDÉ, J.C. LARCHER et A. WOLFF)

La glutamylation, caractérisée dans notre laboratoire, est la modification post-traductionnelle majeure des tubulines neuronales. Elle consiste en l'addition séquentielle de 1 à au moins 6 unités glutamyles sur le gamma-carboxyle du résidu Glu 445, tout près de l'extrémité C-terminale de la molécule. En utilisant des peptides synthétiques modifiés chimiquement (en collaboration avec le D<sup>r</sup> H. Mazarguil, C.N.R.S., Toulouse) qui miment l'extrémité C-terminale de l' $\alpha$ -tubuline glutamylée, nous avons obtenu des anticorps poly et monoclonaux qui reconnaissent spécifiquement la tubuline polyglutamylée. L'utilisation de ces anticorps nous a permis de découvrir que :

1. la sous-unité  $\beta$ -tubuline, comme les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta'$ , est également glutamylée dans sa région C-terminale ;

2. la glutamylation n'est pas restreinte aux populations neuronales mais concerne apparemment tous les types cellulaires. Toutefois, contrairement aux neurones où l'accumulation des tubulines glutamylées est considérable, les tissus non nerveux utilisent la glutamylation à des taux extrêmement faibles. De plus, dans ces tissus, seule la sous-unité  $\beta$  est concernée ;

3. au cours de la spermiogenèse, la spermatide glutamyle fortement ses microtubules flagellaires et pas du tout ceux de la manchette (travaux réalisés en collaboration avec le P<sup>r</sup> J.P. Fouquet). Dans une même cellule, plusieurs sous-populations de microtubules peuvent ainsi être distingués sur la base de leur capacité à être ou non glutamylées. La glutamylation de certains microtubules pourrait leur conférer des propriétés particulières.

La majorité des modifications post-traductionnelles de la tubuline décrites jusqu'à présent sont concentrées dans les domaines C-terminaux des deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , 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 protéines associées aux microtubules, ou MAPs (MAP1, MAP2, Tau, moteurs moléculaires...), correspondent justement à 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 cette diversité chimique de la tubuline sur l'organisation structure-fonction des microtubules, nous avons engagé une analyse des protéines Tau dans le neurone. Ces protéines présentent une hétérogénéité exceptionnelle : plus de 60 espèces distinctes ont été mises en évidence dans le cerveau de rat ou de souris. Ces différentes formes de Tau apparaissent séquentiellement au cours du développement et de la différenciation neuronale. La majorité de ces protéines dérive par phosphorylation de 4 produits primaires, eux-mêmes issus d'un même gène par épissage alternatif.

Des expériences de « Blot overlay » ont été entreprises afin de mettre en évidence l'existence d'interactions préférentielles entre les diverses isotubulines et iso-tau's.

#### *Expression et régulation des gènes de l'énolase au cours de la myogenèse*

(M. LUCAS, S. BROSSET, A. KELLER, N. LAMANDÉ, M. LAZAR, J-D. ROUZEAU)

Nos travaux actuels ont pour objectif global de contribuer à élucider les mécanismes moléculaires de la différenciation myogénique. Nous avons précédemment montré que l'activation du gène codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'énolase (abréviation : gène  $\beta$ ) est un événement spécifique et précoce du développement des muscles striés. Les transcrits du gène  $\beta$ , déjà détectables dans le tube cardiaque et les myotomes néoformés dans les somites, s'accumulent ensuite fortement à certains stades définis de la myogenèse foetale et post-natale. Ces premières études *in vivo* (Keller *et al.*, MOD, sous presse ; Lucas *et al.*, Differentiation, sous presse) ont indiqué l'existence de plusieurs niveaux d'expression et de régulation ontogénique du gène  $\beta$  et nous cherchons maintenant à caractériser les facteurs génétiques et épigénétiques impliqués. Les études effectuées cette année dans cette perspective ont été centrées sur :

### 1. *Les modalités d'expression des gènes de l'énolase dans le muscle cardiaque*

On sait qu'un même gène est soumis à des mécanismes de régulation différents dans le muscle squelettique et dans le muscle cardiaque. Nous avons donc entrepris une étude spécifiquement consacrée à la régulation de l'expression des gènes de l'énolase dans le cœur. Le projet en cours est une analyse quantitative de l'évolution des niveaux des transcrits et des sous-unités de l'énolase  $\alpha$  (ubiquitaire) et  $\beta$  (spécifique des cardiomyocytes) dans le cœur en développement et dans le cœur adulte hypertrophique chez le Rat (collaboration avec L. Rappaport, J.L. Samuel et K. Schwartz, INSERM U127). Nos premiers résultats indiquent que l'expression du gène  $\beta$  augmente préférentiellement dans la période post-natale du développement cardiaque et dépend du niveau d'hormone thyroïdienne. Dans le cœur soumis à une surcharge hémodynamique par sténose abdominale, une diminution importante du niveau de l'ARNm  $\beta$  accompagne la diminution adaptative de la vitesse de contraction du muscle cardiaque.

### 2. *L'étude des mécanismes de régulation transcriptionnelle du gène $\beta$ dans des systèmes modèles en culture*

Par une méthode récente de caractérisation des ARN néosynthétisés, nous avons montré que la différenciation myogénique en culture s'accompagne d'une forte augmentation de la transcription du gène  $\beta$  ; cependant ce gène est déjà exprimé à faible niveau au stade myoblastique. En collaboration avec D. Montarras et C. Pinset (Institut Pasteur), nous avons montré que cette expression initiale n'est pas constitutive mais peut être contrôlée négativement, en parallèle avec l'expression du gène MyoD, par certains facteurs de croissance. L'analyse de lignées établies ou dérivées des fibroblastes 10T1/2 par transfection de chacun des facteurs de la famille MyoD permet de proposer que l'activation initiale du gène  $\beta$  requiert l'expression d'au moins l'un de ces facteurs myogéniques.

Pour caractériser les éléments de séquence et les facteurs nucléaires directement impliqués dans le contrôle de l'expression du gène  $\beta$  endogène au stade myoblastique et au cours de la différenciation terminale, nous avons entrepris des études au niveau du gène  $\beta$  cloné et des régions génomiques adjacentes. Une première série de constructions dans un vecteur d'expression incluant le gène bactérien CAT et diverses portions de la région amont du gène  $\beta$  a été effectuée et éprouvée par transfection dans des myoblastes, des myotubes et des fibroblastes. Une activité promotrice a été caractérisée dans la région amont proximale, mais la région analysée (2000 bp) ne comporte pas de séquences responsables de l'expression spécifique du gène  $\beta$  dans les cellules musculaires. La recherche de ces séquences dans d'autres régions potentiellement régulatrices du gène est en cours.

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

(M.-M. PORTIER, O. BOUSQUET, K. DJABALI, M. ESCURAT, F. LANDON, S. LAZEREG)

Nous avons montré que la périphérine, protéine de filament intermédiaire neuronale, est exprimée dans les neurones moteurs, sensoriels et sympathiques. Mais, au cours du développement, elle est également présente dans les ébauches de la médullo-surrénale et du pancréas, puis, son expression sera ensuite réprimée dans les organes adultes correspondants. Elle est toujours co-exprimée avec les protéines de neurofilaments (à l'exception des neurones olfactifs), ce qui pose le problème des rôles respectifs de ces deux types de protéines de filaments intermédiaires. Les travaux que nous venons de réaliser peuvent se résumer ainsi :

1. *Existence d'autoanticorps dirigés contre la périphérine dans des sujets atteints de diabète insulino-dépendant*

Nous avons constaté que le sérum de souris NOD, génétiquement diabétique anticorps et un anticorps monoclonal préparé à partir de cette même lignée reconnaissent exclusivement la périphérine. Celle-ci étant exprimée au cours du développement dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans et les autoanticorps apparaissant lorsque ces îlots commencent à être détruits, nous en concluons qu'il subsiste une faible expression de périphérine dans ces cellules. Des taux importants d'auto-anticorps anti-périphérine ont également été détectés chez des patients atteints de diabète insulino-dépendant.

2. *Expression de la périphérine en fonction de l'environnement*

Trois types d'expériences ont été réalisées : a) des neurones embryonnaires d'une part du cortex cérébral, d'autre part de ganglions spinaux, ont été cultivés respectivement en présence de cellules de Schwann et (ou) de fibroblastes ou bien d'astrocytes ; b) des tronçons de nerf périphérique ont été greffés d'un hémisphère cérébral à l'autre chez le rat ; c) des neurones du cortex cérébral embryonnaire de rat ont été injectés dans la partie distale d'un nerf sciatique sectionné. Dans tous les cas, quelques neurones originaires du cortex se mettent à exprimer de la périphérine, et il semble que les fibroblastes seraient responsables de cette induction.

3. *Inhibition de l'expression de périphérine*

Les premiers résultats obtenus montrent que la suppression de cette expression inhibe la régénération des neurites.

#### 4. Localisation des isoformes de périphérine

Il existe trois formes de périphérine provenant de l'épissage alternatif du produit d'un même gène. Les deux formes minoritaires sont présentes en proportions très variables d'un tissu ou d'une espèce à l'autre. Des anticorps dirigés contre les séquences spécifiques des deux formes minoritaires ont été obtenus et seront utilisés pour étudier les participations respectives des trois formes à la constitution du réseau de périphérine.

Nous poursuivons l'étude sur l'attachement de la périphérine aux membranes ce qui nous paraît particulièrement important pour parvenir à ne définir le rôle de cette protéine.

#### *Etude des décarboxylases des acides aminés*

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

Les recherches que nous avons développées cette année se sont orientées dans deux directions particulières : l'étude du gène de la DOPA décarboxylase (AADC) et la réalisation d'outils moléculaires et immunologiques, permettant de comprendre les mécanismes de l'expression et du contrôle de l'expression des décarboxylases d'acides aminés dont les produits jouent un rôle de neuromédiateurs.

#### 1. Structure et localisation du gène de la DOPA décarboxylase (AADC)

Après avoir cloné et séquencé l'ADNc de l'AADC, nous nous sommes intéressés à la structure de son gène et à sa localisation sur le génome du rat et de la souris.

La carte physique du gène a été entreprise chez le rat. A l'aide de sondes d'ADNc de la AADC, une marche sur le chromosome a été entreprise par criblage d'une banque génomique de rat. D'ores et déjà le génome apparaît de grande taille > 60 000 paires de bases de très nombreux introns morcellent donc l'ADN complémentaire.

En parallèle, des sondes soit d'ADNc, soit génomiques ont été fabriquées de manière à localiser sur le génome murin et de rat le locus des décarboxylases qui ont des analogies de structures primaires. Les premiers résultats ont montré que le gène de l'AADC que nous avons précédemment localisé sur le chromosome 7 de l'homme se trouve sur le chromosome 11 de la souris. La localisation des gènes glutamate décarboxylase (GAD) et histidine décarboxylase (HDC) sur les chromosomes de rat sont en cours de détermination et devrait permettre de mieux appréhender les correspondances entre le génome du rat, de la souris et de l'homme.

## 2. Préparation d'antisérums spécifiques du neurone

La préparation d'antisérums contre des protéines de synthèse des neuromédiateurs a été entreprise, les antigènes ont été préparés soit à partir de protéines purifiées (NGF), soit à partir de polypeptides synthétiques (choline-acétyl-transférase) couplés sur des protéines porteuses (sérum albumine) soit à partir de protéines produites par recombinaison génétique dans *E. coli* (GAD, AADC). Dans tous les cas, des antisérums ont été produits chez le lapin et ces outils immunologiques, après caractérisation et contrôle, ils seront utilisés pour des caractérisations immunochimiques et immunocytochimiques, de ces marqueurs dans le tissu nerveux au cours du développement et dans diverses situations physiologiques ou pathologiques.

*Immortalisation cellulaire. Transfert, intégration et expression de gènes dans les cellules nerveuses. Contrôle de la division cellulaire et de la différenciation*  
(P. ROUGET, R. BERNARD, I. BORDE, E. DUPONT, C. EVRARD, E. GALIANA, M. LE BERT)

Nos recherches ont pour objectif général de contribuer à l'étude et à la compréhension des mécanismes moléculaires intervenant dans la différenciation, le contrôle de la division et les interactions des cellules nerveuses. Notre travail peut être schématiquement subdivisé en plusieurs volets.

### 1. Immortalisation de cellules nerveuses et précurseurs

Nous avons poursuivi notre travail concernant l'étude du transfert, de l'intégration et de l'expression d'oncogènes viraux, dans les cellules nerveuses. De nouvelles catégories de lignées soit immortalisées, soit transformées, ont ainsi été établies : certaines correspondent à différents précurseurs gliaux, d'autres à des précurseurs bi ou multipotents astrocyte-neurones. A l'aide d'autres vecteurs (dont certains sont conditionnels ou inductibles) et d'autres méthodes résumées ci-dessous, nous étendons ce travail à d'autres précurseurs.

### 2. Construction de vecteurs immortalisants à expression « ciblée »

Afin d'augmenter l'efficacité des transferts de gènes et de focaliser l'expression des séquences transférées, nous avons placé des gènes « immortalisants » (LT de polyome ; tsa « thermosensible ») sous contrôle de régions régulatrices « gliotropes » ou « neurotropes » (issues du virus JC et des « gènes » « Glial Fibrillary Acidic Protein » et « Neurofilaments »). Des vecteurs rétroviraux recombinants ont aussi été obtenus, en associant des gènes immortalisants 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. Marquage et modifications génétiques

Avec une démarche analogue à celles du § 2, nous avons construit divers vecteurs associant les séquences nlslacZ aux régions régulatrices neurotropes et gliotropes précédentes. L'intégration et l'expression de ces vecteurs conduit à un marquage des cellules, permettant d'étudier leur différenciation 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 des cellules chez l'animal. Des constructions de vecteurs (dont certains sont inductibles) et exprimant des anti-sens d'oncogènes sont à l'étude.

### 4. Différenciation, interactions, prolifération

Sur différentes lignées de précurseurs (astrogliaux, mixtes oligodendrocyte-astrocyte, bi et multipotents astrocyte-neurones), nous avons délimité plusieurs étapes de différenciation et avons entrepris d'étudier l'effet de quelques facteurs (FGF, TGF- $\beta$ , GMF- $\beta$ , NGF, NT-3, NT-4, acide rétinoïque) sur cette différenciation et le contrôle de la prolifération cellulaire. Sur certaines lignées, nous avons entrepris un travail concernant l'identification, l'expression et le clonage de gènes codant pour des facteurs transcriptionnels intervenant dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation. Plusieurs séquences exprimées de manière différentielle selon l'état prolifératif et au cours de la différenciation sont en cours d'analyse.

### 5. Systèmes transgéniques

A l'aide des vecteurs « prNFL-grand T » et « prNFL-nlslacZ », résumés dans les § 2 et 3, nous avons maintenant obtenu au laboratoire diverses transgéniques, dont des double-transgéniques portant à la fois les séquences nlslacZ et grand T de polyome, chacune sous le contrôle de la région promotrice du gène NFL. Leur étude a déjà montré une expression des transgènes dans les précurseurs neuronaux, avec une expression différentielle selon les stades du développement. Ces transgéniques devraient permettre l'établissement de lignées à la fois immortalisées et génétiquement marquées. L'obtention de double-transgéniques prGFAP-LT/prGFAP-nlslacZ et prJC-LT/prJC-nlslacZ est en cours.

Nous avons également construits des vecteurs intégrant les séquences grand T (et tsa) par *recombinaison homologue* dans le gène homéotique Hox 3.1 et permettant de focaliser à la fois l'expression des gènes transférés et leur intégration dans le génome. L'un des buts est de focaliser l'immortalisation et le marquage génétique en direction des précurseurs que nous isolerons d'abord de souris chimères, puis des transgéniques correspondantes.

## PUBLICATIONS

G. DOS SANTOS, S. GAUTRON, A. KOULAKOFF, D. PINTO-HENRIQUE, P. ASCHER et Y. BERWALD-NETTER, *Molecular characterization of a rat glial Na channel isoform* (*Soc. Neurosci. Abst.*, 17, 953, 1991).

S. GAUTRON, G. DOS SANTOS, D. PINTO-HENRIQUE, A. KOULAKOFF, F. GROS et Y. BERWALD-NETTER, *The glial voltage-gated sodium channel: cell and tissue-specific mRNA expression* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, sous presse, 1992).

J.P. HUGNOT, H. GILGENKRANTZ, N. VINCENT, P. CHAFEY, G.E. MORRIS, A.P. MONACO, Y. BERWALD-NETTER, A. KOULAKOFF, J.C. KAPLAN, A. KAHN et J. CHELLE, *Novel products of the dystrophin gene: a distal transcript initiated from a unique alternative first exon encoding a 75 kDa protein widely distributed in non-muscle tissues* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, sous presse, 1992).

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, 57-65, 1991).

J.C. LARCHER, M. BASSEVILLE, J.L. VAYSSIÈRE, L. CORDEAU-LOSSOUARN, B. CROIZAT et F. GROS, *Growth inhibition of NIE-115 mouse neuroblastoma cells by c-myc or N-myc antisense oligodeoxynucleotides causes limited differentiation but is not coupled to neurite formation* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, sous presse, 1992).

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 neuroblastoma cells. In vitro* (*Cell. Develop. Biol.*, sous presse, 1992).

B. EDDÉ, J. ROSSIER, J.P. LE CAER, Y. BERWALD-NETTER, A. KOULAKOFF, F. GROS et P. DENOULET, *A combination of posttranslational modifications is responsible for the production of neuronal alpha-tubulin heterogeneity* (*J. Cell. Biochem.*, 46, 134-142, 1991).

L. PATURLE-LAFANECHÈRE, B. EDDÉ, P. DENOULET, A. VAN DORSSELAER, H. MAZARGUIL, J.P. LE CAER, J. WEHLAND et D. JOB, *Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated* (*Biochemistry*, 30, 10523-10528, 1991).

B. EDDÉ, J. ROSSIER, J.P. LE CAER, C. PROMÉ, E. DESBRUYÈRES, F. GROS et P. DENOULET, *Polyglutamylated  $\alpha$ -tubulin can enter the tyrosination/detyrosination cycle* (*Biochemistry*, 31, 403-410, 1992).

J.C. LARCHER, D. BOUCHER, I. GINZBURG, F. GROS et P. DENOULET, *Heterogeneity of Tau proteins during mouse brain development and differentiation of cultured neurons* (*Dev. Biol.*, sous presse, 1992).

M. LUCAS, C. GOBLET, A. KELLER, N. LAMANDÉ, F. GROS, R.G. WHALEN, et M. LAZAR, *Modulation of embryonic and muscle-specific enolase gene products in the developing mouse hindlimb* (*Differentiation*, sous presse, 1992).

A. KELLER, M.-O. OTT, N. LAMANDÉ, M. LUCAS, F. GROS, M. BUCKINGHAM et M. LAZAR, *Activation of the gene encoding the glycolytic enzyme  $\beta$  enolase during early myogenesis precedes an increased expression during fetal muscle development* (*Mechanisms of Development*, sous presse, 1992).

R. MAUNOURY, M.M. PORTIER, N. LÉONARD, D. McCORMICK, *Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in adrenocortical and Leydig cells of the Syrian golden hamster* (*J. Neuroimmunol.*, 35, 119-129, 1991).

M. ESCURAT, K. DJABALI, C. HUC, F. LANDON, C. BÉCOURT, C. BOITARD, F. GROS, M.M. PORTIER, *Origin of the beta 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 RIN5F cell line* (*Dev. Neurosci.*, 13, 424-432, 1991).

C. BOITARD, M.C. VILLA, C. BÉCOURT, H. PHAM GIA, C. HUC, P. SEMPE, M.M. PORTIER, J. F. BACH, *Peripherin : an islet antigen that is cross-reactive with nonobese diabetic mouse class II gene products* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 172-176, 1992).

M.C. VILLA, C. BÉCOURT, H. PHAM GIA, P. SEMPE, M.M. PORTIER, J.C. BACH, C. BOITARD, *Autoantibodies against pancreatic  $\beta$ -cells : characterization by Western blot analysis in the non-obese diabetic (NOD) mouse* (*J. Autoimmunity*, 5, 47-58, 1992).

M.M. PORTIER, *Le cytosquelette neuronal : aspects structuraux, fonctionnels et dynamiques* (*Rev. Neurol.*, Paris, 148, 1-19, 1992).

A. MONCLA, F. LANDON, M.G. MATTEI, M.M. PORTIER, *Chromosomal localisation of the mouse and human peripherin genes* (*Genet. Res. Camb.*, 58, 125-129, 1992).

M. FERRERO-POUS, F. GOSSELIN, V. LE DOUSSAL, F. SPYRATOS, *Caractérisation de l'anticorps monoclonal anti-cytokératines KLI par électrophorèse bidimensionnelle suivie d'immuno-détection* (*Ann. Pathol.*, 12, 141-142, 1992).

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.*, 57, 1212-1222, 1991).

P. ROUGET, M. LE BERT, I. BORDE et C. EVRARD, *Generation of neural cell lines by transfer of viral oncogenes. Cell lines in Neurobiology* (IRL Oxford University Press, *Pract. Appr. Ser.*, 27-54, 1992).

D. TORU-DELBAUFFE, D. BAGDASSARIAN, D. BOTH, R. BERNARD, P. ROUGET et M. PIERRE, *Effect of TGF- $\beta$ 1 on the proliferation and differentiation of an immortalized astrocyte cell line : relationship with extracellular matrix* (*Exp. Cell Res.*, sous presse, 1992).

M. OLOMUCKI, *De la chimie à la biologie* (*Science et Avenir*, 536, 56-59, interview de S. Huet, 1991).

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* (*Antiviral Chem. Chemother.*, 2, 329-336, 1992).

P. ROQUES, J.Y. LE GALL, L. LACOMBE et M. OLOMUCKI, *Reactions of nucleic acid bases with  $\alpha$ -acetylenic esters, Part V. Synthesis and properties of adenosine and cytidine derivatives* (*J. Org. Chem.*, 57, 1579-1585, 1992).

#### THÈSE DE DOCTORAT

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

M. ESCURAT, « *Etude de l'expression dynamique de la périphérine, protéine constitutive de filament intermédiaire neuronale* ». *Biochimie*, février 1992 (Université Paris VI).

#### DIPLÔMES D'ÉTUDES APPROFONDIES

M.S. AUDEBERT, *Caractérisation d'un anticorps monoclonal spécifique de la tubuline glutamylée. Distribution tissulaire et cellulaire de l'antigène et étude au cours du développement*. *Biochimie*, septembre 1991 (Université Paris VI).

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

Le Professeur GROS a donné plusieurs conférences en France (Symposium International sur le Cancer à Concarneau ; Conférence Générale sur les Maladies Génétiques à la Sorbonne dans le cadre du MURS, etc.) et à

l'étranger (par ex : sur invitation du professeur R. Thomas à l'Université libre de Bruxelles ; à Jérusalem, au Congrès International de Biochimie, etc.).

M<sup>me</sup> Y. BERWALD-NETTER a été invitée à donner un séminaire : *Les isoformes des canaux sodiques voltage-dépendants : aspects cellulaire et moléculaire*, au C.E.A. (Service Hospitalier Frédéric Joliot ; juin 1991). Elle a été invitée à donner un cours dans le cadre du programme international de Neurosciences : *Voltage-gated sodium channels in mammalian brain and in nervous system cell cultures - A molecular and cellular analysis* (Ecole d'été d'Elbe ; septembre 1991). Elle a également présenté un séminaire sur invitation : *Voltage-gated Na channels in neurons and glia : cellular molecular and developmental aspects* (Université de Rome dans le Département de Biologie Cellulaire ; octobre 1991). Elle a organisé une table ronde sur : *Molecular Aspects of Ionic Channels*, dans le cadre des European Winter Conferences on Brain Research (La Plagne ; mars 1992).

M<sup>lle</sup> C. ANDRÉ a présenté une communication affichée : *Diversity of muscarinic cholinergic receptors in cultures of neurons and astrocytes isolated from distinct mouse brain areas*, 3<sup>e</sup> Congrès International Brain Research Organization (Montréal ; août 1991).

M. G. DOS SANTOS a présenté une communication affichée : *Molecular characterization of a rat glial Na channel isoform*, 21<sup>e</sup> Meeting annuel de la Société Américaine des Neurosciences (La Nouvelle-Orléans ; novembre 1991).

M<sup>me</sup> A. KOULAKOFF a donné une conférence : *Développement des canaux ioniques*, dans le cadre du D.E.A de Physiologie du Développement (Université Paris VI ; janvier 1992).

M. B. CROIZAT a participé au IV<sup>e</sup> Colloque National de l'Association Française contre les Myopathies sur les Maladies Neuromusculaires (Montpellier, juin 1991).

M. et M<sup>mes</sup> M. BASSEVILLE, M.C. LAGRANGE, F. GROS et B. CROIZAT ont participé au 1<sup>er</sup> Colloque de la Société des Neurosciences (Strasbourg ; mai 1992) où M<sup>me</sup> N. DEMIRKAPI a présenté une communication : *Contribution à l'étude du phénotype moléculaire correspondant à la pathologie amyotrophie spirale (A.M.S). Recherche de marqueurs du motoneurone.*

M. S. AUDEBERT, D. BOUCHER, P. DENOULET, B. EDDÉ et J.C. LARCHER ont participé à la XII<sup>e</sup> Réunion du Club Français du Cytosquelette (Banyuls ; juin 1992) où M. S. AUDEBERT a présenté une communication : *Glutamylatation et Dynamique des Microtubules.*

M. P. DENOULET a été invité à deux Congrès, où il a donné deux conférences : 1) *Expression of isotubulins and tau's during neuronal differentiation*, au VI<sup>e</sup> Congrès Annuel des Fédérations de Biologie Expérimentale (Caxambu, Minas-Gerais, Brésil ; août 1991) et 2) *Tubulin and Tau heteroge-*

*neities in neuronal differentiation : functional polymorphisms ?*, au Congrès Cytosquelette et Différenciation Cellulaire (Rouen ; septembre 1991).

Il a été invité à donner six conférences : 1) *Expression and roles of tubulin and MAP polymorphisms in the nervous system*, à l'Institut de Biophysique Carlos Chagas, Université Fédérale de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brésil ; août 1991) ; 2) *La saga des protéines microtubulaires (suite) : une complexité indispensable ?*, Centre de Génétique Moléculaire (Gif-sur-Yvette ; décembre 1991) ; 3) *Les moteurs des microtubules : kinésine et dynéines. Le transport vectorisé des vésicules et des organites*, DEA de Biochimie (Paris VI ; février 1992) ; 4) *Hétérogénéités fonctionnelles des protéines microtubulaires dans le neurone ?* au Laboratoire de Neuropharmacologie, Institut de Biologie du Collège de France (Paris ; février 1992) ; 5) *Polymorphismes protéiques des tubulines et des MAPs : complexités indispensables ?*, à l'École Normale Supérieure (Paris ; avril 1992) ; 6) *Polymorphisme des protéines microtubulaires neuronales*, Cours de Biologie Moléculaire de la Cellule, Institut Pasteur (Paris ; avril 1992).

Il a organisé la XII<sup>e</sup> Réunion Annuelle du Club Français du Cytosquelette qui s'est tenue à Banyuls du 4 au 6 juin 1992.

M. B. EDDÉ a été invité à donner une conférence : *Polymorphisme post-traductionnel de la tubuline du système nerveux* à l'Institut de Biologie Physico-Chimique (Paris ; mars 1992).

M. J.C. LARCHER a été invité à donner deux conférences : 1) *Microtubule proteins polymorphism in the nervous system*, au club do citoesqueletto, Université Fédérale de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brésil ; février 1992) ; 2) *Cellular models in the neuronal differentiation*, à l'Institut Carlos Chagas Filho, Université Fédérale de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brésil ; février 1992).

M<sup>me</sup> A. KELLER a été invitée à donner un séminaire : *The muscle specific form ( $\beta$ ) of enolase is an early marker of myogenesis*, Pharmacology Department, Yale School of Medicine (New Haven, Co, USA ; avril 1992).

M<sup>me</sup> M. LAZAR a participé à la Conférence Jacques Monod « Early steps in embryonic development » où elle a présenté une communication : *Regulation of  $\beta$  enolase gene expression at early steps of myogenesis* (Aussois ; mars 1992).

M<sup>me</sup> M.M. PORTIER a présenté six séminaires : 1) *Caractérisation d'une protéine de filament intermédiaire neuronale, la périphérine, au moyen de techniques biochimiques*, Formation Permanente (Université Paris VII, octobre ; 1991) ; 2) *Structure et fonctions des protéines de filaments intermédiaires*, DESS « Modèles cellulaires *in vitro* » (Université Paris Val-de-Marne ; novembre 1991) ; 3) *La périphérine, protéine de filament intermédiaire neuronale*, DESS « Modèles cellulaires *in vitro* » (Université Paris Val-de-Marne ; novembre 1991) ; 4) et 5) *A la recherche d'une fonction pour la périphérine, protéine*

*de filament intermédiaire neuronale*, Institut d'Histologie et d'Embryologie (Lausanne, avril 1992) et Institut Jacques Monod (Paris, avril 1992); 6) *Périphérine et neurofilaments : expression spatio-temporelle et rôles respectifs* (Service F. Joliot-Curie, Hôpital d'Orsay ; juin 1992).

Elle a été invitée : 1) au colloque « Cytosquelette et Communications Cellulaires » (Rouen ; septembre 1991) où elle a présenté un exposé : *Transitory expression of neuronal intermediate filament proteins in future endocrine cells during the development of the rat* ; 2) au « 5<sup>th</sup> International Congress on Cell Biology » (Madrid ; juillet 1992) où elle a présenté un exposé : *Expression of neuronal intermediate filament proteins and neuronal morphogenesis*. Elle a présenté deux communications : *Expression of peripherin, a neuronal intermediate filament protein, in endocrine cells*, 9<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (La Grande Motte ; juin 1992 et « Gordon Conference on Intermediate Filaments » ; 29 juin-3 juillet 1992).

M<sup>me</sup> F. LANDON a présenté trois communications : *Localization of the expression of peripherin isoforms* (Cytosquelette et Communications Cellulaires, Rouen ; septembre 1991, Gordon Conference on Intermediate Filament Proteins, 29 juin-3 juillet 1992, 5<sup>th</sup> International Congress on Cell Biology, Madrid ; juillet 1992).

M<sup>lle</sup> F. GOSSELIN a présenté quatre communications : 1) *Cytokeratin patterns of human gingival epithelium reconstituted in vitro using two cell culture procedures*, Cytosquelette et Communications Cellulaires (Rouen ; septembre 1991) ; 2) *Comment reconstituer in vitro des feuilletts épithéliaux de gencive humaine ? Deux procédés de cultures cellulaires et expression des kératines*, XII<sup>es</sup> Journées Françaises de Parodontologie (Malte ; juin 1992) ; 3) *Profils électrophorétiques bi-dimensionnels des cytokératines exprimées dans des épithéliums reconstitués in vitro selon deux procédés différents de cultures cellulaires*, XII<sup>es</sup> Journées Françaises de Parodontologie (Malte ; juin 1992) ; 4) *How to reconstitute in vitro human gingiva epithelial sheets ? Two cell culture procedures and keratin expression*, 70<sup>th</sup> General Session of the International Association for Dental Research (Glasgow ; juillet 1992).

M. M. ESCURAT a donné un séminaire : *La périphérine, protéine de filament intermédiaire neuronale ; étude de son expression et recherche de son rôle physiologique*, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire, Moléculaire et Clinique, INSERM U134 (Paris, mars 1992). Il a présenté trois communications : 1) et 2) *Epigenetic control and inhibition of the expression of peripherin, a neuronal intermediate filament protein*, 31<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (Boston ; décembre 1991) et 9<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (La Grande Motte ; juin 1992) ; 3) *Contrôle épigénétique et inhibition de l'expression de la périphérine, protéine de filament intermédiaire neuronale*, 1<sup>er</sup> Colloque de la Société des Neurosciences (Strasbourg ; mai 1992).

M<sup>lle</sup> I. BORDE a présenté une communication affichée : *Immortalization of bipotential neuron-astrocyte precursor cells*, 9<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (La Grande Motte ; juin 1992).

Mme C. EVRARD a été invitée à trois colloques internationaux où elle a présenté les communications suivantes : 1) *Differentiation of immortalized neural precursor cell lines. Effect of growth factors.* : Second Int. Conf. on Nerve growth factor and related molecules (Sydney, Australie ; juillet 1991). 2) *Immortalized and genetically marked neural cell lines from transgenic mice*, 33<sup>th</sup> Meeting, Amer. Soc. Neurochem (Houston, USA ; mars 1992). 3) *Targeted expression of an immortalizing oncogene and of a reporter gene in transgenic mice*, 9<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (La Grande Motte ; juin 1992).

M. P. ROUGET a organisé un workshop *Immortalization of cell lines* dans le cadre du 9<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (La Grande Motte ; juin 1992). Il a également été invité à participer à deux autres Colloques internationaux où il a présenté deux communications : 1) *Differentiation and genetic labelling of immortalized bipotential neural precursor cells*, 13<sup>th</sup> Meeting Int. Soc. Neurochem. (Sydney, Australie ; juillet 1991). 2) *Neural expression of developmentally regulated genes in transgenic mice*, 33<sup>th</sup> Meeting Amer. Soc. Neurochem. (Houston, USA, mars 1992).

M<sup>me</sup> A. OLOMUCKI et M. M. OLOMUCKI ont participé au congrès « Frontiers of life » (Blois ; octobre 1991). M. M. OLOMUCKI a été invité à donner une conférence : *Evolution chimique et animation de la matière*. Institut Curie - Biologie (Orsay ; novembre 1991).

#### DISTINCTIONS, PRIX

Le Professeur GROS a été nommé « Fellow » du Collège Royal de Pathologie de Grande-Bretagne (Fellow of the Royal College of Pathology) et fait membre de l'Indian National Academy of Sciences.

M<sup>lle</sup> F. GOSSELIN a reçu le prix de la meilleure communication affichée aux XII<sup>es</sup> Journées Françaises de Parodontologie.

GROUPE DE NEUROENDOCRINOLOGIE CELLULAIRE  
ET MOLÉCULAIRE — U.R.A. C.N.R.S. 1115

Responsable : M<sup>me</sup> C. TOUGARD, Directeur de Recherche, C.N.R.S.

Le Groupe de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire a été dirigé par Madame Andrée Tixier-Vidal jusqu'en décembre 1991. Depuis cette date, il a subi une restructuration et son nouvel intitulé est : « Biologie de la Cellule Neuroendocrine ». La responsabilité est assurée par Madame C. Tougard, Directeur de Recherche au C.N.R.S. L'objectif général des recherches réside dans l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans la sécrétion antéhypophysaire. Des approches variées de biologie cellulaire et de génétique moléculaire sont appliquées à des modèles de cellules antéhypophysaires en culture (cellules en lignées continues et cultures primaires). Toutefois, jusqu'à la fin de l'année 1991, les recherches se sont poursuivies également au niveau hypothalamique, sur des cultures primaires de neurones.

RAPPORT D'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE  
Juin 1991 — Juin 1992

*I. MÉCANISMES CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES  
DE LA SÉCRÉTION DE PROLACTINE*

A. BIOLOGIE DU PROCESSUS SÉCRÉTOIRE DANS LA CELLULE À PROLACTINE  
(C. TOUGARD (responsable), N. BRUNET DE CARVALHO, A. MORIN, E. VILA-PORCILE, L.E. NASCIUTTI, S. VAN DE MOORTELE, L. MULLER, R. PICART, A. BARRET)

Les recherches sont restées centrées, d'une part, sur les voies intracellulaires de sécrétion et sur les mécanismes de migration et de tri des protéines exportées et, d'autre part, sur le trafic membranaire qui intervient à différentes étapes du processus sécrétoire. En particulier, une étude des formes moléculaires de la prolactine au cours de son transport intracellulaire a été entreprise. Parallèlement à cette étude, la régulation de la sécrétion de la

prolactine de rat est analysée dans différentes lignées de cellules eucaryotes en culture, transfectées avec un vecteur d'expression contenant la séquence ADN complémentaire de la prolactine de rat. Cette analyse est un préalable à une approche de mutagenèse dirigée qui sera menée pour tenter d'identifier des signaux présents sur la molécule de prolactine, qui pourraient être impliqués dans son transport intracellulaire et son adressage. Enfin, la caractérisation d'une sonde immunologique dirigée contre des antigènes de la membrane des grains de sécrétion des cellules antéhypophysaires, communs aux membranes des grains de sécrétion de cellules endocrines et exocrines, a été poursuivie.

Les résultats publiés concernant certains aspects de ces recherches :

*Détection des composants majoritaires des membranes basales antéhypophysaires « in vivo » et « in vitro »*

(VILA-PORCILE *et al.*, 1992, a et b)

La recherche de différents composants présents dans les membranes basales de l'antéhypophyse de rat « in vivo » et dans des cultures primaires d'antéhypophysés de rat « in vitro » a donné lieu à 2 publications dans *Anatomical Record*. Les composants majoritaires, la laminine, l'entactine, l'héparan sulfate protéoglycan et le collagène détectés « in vivo » sont également décelés « in vitro » dans un réseau de matériel extracellulaire et dans les fibroblastes. Comme « in vivo », seule la laminine est exprimée à l'intérieur des cellules endocrines et folliculo-stellaires. Ainsi, une coopération entre cellules endocrines d'une part, pour la production de la laminine, et cellules non endocrines d'autre part, pour la production des quatre constituants des membranes basales, se met en place « in vitro » pour l'élaboration d'une nouvelle matrice extracellulaire. Les cellules à prolactine en lignée continue, les cellules GH3B6, d'origine tumorale, n'expriment, quant à elles, aucun de ces constituants.

*Comparaison des effets d'un abaissement de la température et de la bréfeldine A sur le processus sécrétoire de la prolactine dans les cellules GH3B6*

(NASCIUTTI *et al.*, 1992)

Un abaissement de la température induit une forte inhibition du transport intracellulaire des produits de sécrétion. La prolactine est alors accumulée à l'intérieur de la cellule, soit au niveau de l'appareil de Golgi (20 °C et 15 °C), soit au niveau du reticulum endoplasmique rugueux (10 °C). Nous avons constaté que, quelle que soit la température utilisée et malgré une redistribution subcellulaire de certains antigènes et quelques perturbations dans l'organisation des compartiments membranaires impliqués dans le processus sécrétoire, ces compartiments conservent leur entité. La bréfeldine A (BFA), une drogue qui inhibe également la sécrétion basale de prolactine, induit aussi une accumulation de prolactine et d'autres protéines, exportées ou membranaires,

dans le reticulum endoplasmique rugueux. Par contre, la BFA provoque une désorganisation complète de l'appareil de Golgi qui n'est plus visible. Ces effets sont réversibles et, après retrait de la BFA, l'appareil de Golgi se remet en place et le transport intracellulaire de l'hormone reprend normalement.

Ainsi, le modèle des cellules à prolactine bloquées par la BFA représente, après retrait de la drogue, un matériel de choix pour étudier la génèse, « de novo », de l'appareil de Golgi et la mise en place des composants qui confèrent à ce compartiment sa spécificité.

#### B. RÉGULATION NEUROENDOCRINE DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROLACTINE

(D. GOURDJI (responsable), J.N. LAVERRIERE, J.L. RICHARD, E. PASSEGUE, V. NGO, D. GROUSELLE, G. BOULLA)

Notre objectif est de comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression du gène de la prolactine et la sécrétion de cette hormone en fonction de l'environnement neurohumoral. L'essentiel de nos recherches s'est poursuivi selon des thèmes déjà engagés : — l'influence de la vitamine D3 sur l'expression des gènes de la prolactine et de l'hormone de croissance, — le contrôle neuroendocrinien de l'expression des proto-oncogènes *fos* et *jun*, — les rôles de l'état de méthylation de l'ADN et du facteur d'expression tissulaire spécifique Pit-1. Les recherches relatives à ce dernier thème reposent sur la mise en œuvre de lignées cellulaires se distinguant par une capacité variable à exprimer le gène de la prolactine en relation avec l'état de méthylation du gène, que l'on peut par ailleurs modifier. L'analyse comparée de l'expression du gène endogène et celle d'un gène artificiel transfecté permet à J.N. LAVERRIERE et V. NGO de postuler l'hypothèse que la capacité d'activation du gène de la PRL par le facteur Pit-1 est conditionnée par l'état de méthylation de l'ADN. Les résultats relatifs aux autres thèmes et ayant donné lieu à publication sont résumés ci-dessous.

##### 1. La vitamine D3 participe au contrôle neuroendocrinien de l'expression du gène de la prolactine

(J.L. RICHARD *et al.*, 1991)

J.L. RICHARD a pu montrer que le métabolite actif de la vitamine D3 (1,25 (OH)<sub>2</sub> D3) participe au contrôle à long terme de l'expression du gène de la prolactine et à la sécrétion de l'hormone. Cet effet est spécifique par rapport à l'expression du gène de l'hormone de croissance. Ses expériences montrent que selon les conditions, la 1,25 D3 est capable ou non de stimuler *per se* l'expression du gène de la PRL. Par contre, en interaction avec le TRH, le seco-stéroïde se comporte toujours comme un facteur stimulant. En effet, soit son effet stimulant propre se surajoute à celui du peptide, soit en

absence de cet effet propre, la 1,25 D3 potentialise l'effet du TRH. La capacité de la 1,25 D3 à stimuler l'expression du gène de la PRL met en jeu des mécanismes sensibles aux esters de phorbol et à la triiodothyronine (T3). Ces mécanismes sont également impliqués dans l'interaction avec le TRH, qui est inhibée par la T3 et amplifiée par un traitement au TPA, entraînant une régulation négative des protéines kinases C (RICHARD *et al.*, 1991).

## 2. L'expression des proto-oncogènes *fos* et *jun* est régulée comme l'activité sécrétoire dans les cellules GH3B6

(E. PASSEGUE (DEA), GOURDJI *et al.*, 1991)

Notre intérêt pour les oncogènes cellulaires *fos* et *jun* se fonde sur le rôle de coordinateur de réponses multigéniques qui leur est attribué. Notre intérêt s'est tout d'abord porté sur le proto-oncogène *c-fos*, et plus récemment sur des membres de la famille *jun*, la lignée GH3B6 exprimant fortement *jun B* et plus modestement *c-jun*. Le TRH induit l'expression de ces deux oncogènes selon une cinétique biphasique très semblable à celle précédemment décrite au laboratoire quant à l'expression du proto-oncogène *c-fos* (WEISMAN *et al.*, 1987). Cette induction est caractérisée par un pic précoce et transitoire, aboli par l'actinomycine D et amplifié par la cycloheximide, comme attendu pour des gènes d'expression précoce. Au contraire, la phase en plateau de longue durée est inhabituelle et pourrait traduire une spécificité tissulaire.

Des corrélations événementielles peuvent être mises en évidence entre l'induction de *c-fos/jun B* et la réponse sécrétoire. En ce qui concerne le TRH, on observe que le pic initial accompagne l'effet sécrétagogue et précède l'activation du gène de la PRL. En ce qui concerne le premier point, c'est-à-dire la libération hormonale, une analyse pharmacologique permet de mettre en évidence un parallélisme, quel que soit le système de transduction mis en jeu. Par contre, ce type d'étude montre que l'induction précoce de *fos/jun* ne s'accompagne pas nécessairement d'une stimulation de l'expression du gène PRL.

## 3. Approche immunologique du récepteur au TRH

(ROLAND *et al.*, 1992)

Cette approche, réalisée pour l'essentiel par D. GROUSSELLE en collaboration avec J. ROLAND (laboratoire de P. CAZENAVE, Institut Pasteur), est basée sur l'hypothèse que des immunoglobulines anti-idiotypiques anti-TRH pourraient être capables de reconnaître le récepteur au TRH qui n'est pas purifié à ce jour. Une série d'anticorps polyclonaux et monoclonaux de première génération (Ab1) a donc été préparée contre une série d'immunogènes (TRH ou TRH-OH couplés à une protéine porteuse). Les Ig polyclonales et monoclonales obtenues ont été criblées sur la base de leur affinité pour le TRH et des analogues du TRH et leurs propriétés ont été comparées

à celles de la capacité de liaison des cellules (ROLAND *et al.*, 1992). Des Ab1 sélectionnés sur ce dernier critère ont permis ensuite de générer des Ab2 anti-anti-TRH, dont la nature anti-idiotypique a été établie « *in vitro* ».

## II. DÉVELOPPEMENT DES NEURONES HYPOTHALAMIQUES

Les recherches se sont poursuivies sur l'ontogénèse du trafic vésiculaire au cours du développement neuronal en culture.

Les neurones hypothalamiques matures possèdent deux voies vésiculaires majeures régulées : les vésicules synaptiques (SV) considérées comme organites de stockage de neurotransmetteurs classiques et les vésicules à cœur dense de large diamètre (LDCV), organites de stockage des neuropeptides parfois associés à des neurotransmetteurs classiques. Ces deux types de vésicules s'accumulent dans les boutons synaptiques, mais leur origine respective au niveau des périkaryons et les mécanismes responsables de leur ségrégation sont encore mal connus. L'ontogénèse de ces deux voies a été étudiée dans des neurones, grâce à la disponibilité de sondes immunologiques dirigées contre des protéines spécifiques, soit de la membrane des vésicules synaptiques (synaptophysine, collaboration avec B. WIEDENMANN, Berlin), soit de la matrice des vésicules à cœur dense (sécréto granine II, collaboration avec W. HUTTNER, Heidelberg).

Par double marquage en immunofluorescence, on a constaté l'apparition simultanée des deux protéines au niveau des périkaryons, plusieurs jours avant la synaptogénèse. Cependant, contrairement à la synaptophysine, la sécréto granine II n'est exprimée que dans une sous-population de neurones et sa distribution n'est pas limitée à la zone périnucléaire Golgienne. La migration post-golgienne des vésicules à sécréto granine précède dans le temps celle des vésicules à synaptophysine. Ensuite, lors de la formation des synapses, l'intensité du signal synaptophysine dépasse largement celle du signal sécréto granine. Cette observation est confirmée par immunodosage. Ces résultats indiquent une biogénèse différentielle des deux types vésiculaires (TIXIER-VIDAL *et al.*, 1992). De plus, Y. KAGOTANI a montré au microscope électronique, par double marquage immunocytochimique, que dans des neurones matures en culture, les deux protéines sont ségréguées à leur sortie du compartiment Golgi trans et ne sont jamais colocalisées, ni dans les neurites, ni dans les boutons synaptiques (KAGOTANI *et al.*, 1991).

Les mécanismes neuronaux du recyclage membranaire et de l'activité endocytique ont été analysés par des méthodes immunocytochimiques et morphométriques dans des neurones matures en culture soumis à des cycles de dépolarisation et repolarisation chimiques (KCl) qui s'accompagnent de déplétion-restauration vésiculaires dans les boutons synaptiques. On a utilisé deux

traceurs d'endocytose (péroxydase de raifort, agglutinine de germe de blé marquée à l'or) qui ont été visualisés au microscope électronique simultanément avec une localisation immunocytochimique de la synaptophysine. Les résultats indiquent que la dépolarisation brève (3 min) provoque une déplétion vésiculaire concomitante d'une augmentation ( $\times 9$ ) de l'activité endocytique de vésicules qui possèdent le diamètre et la présence de synaptophysine caractéristiques des vésicules synaptiques. Ils suggèrent donc un recyclage local, direct des vésicules synaptiques. Par contre, les dépolarisations prolongées (15-30 min) mettent en jeu d'autres compartiments membranaires de l'endocytose (KAGOTANI *et al.*, 1992).

Les recherches sur l'implication éventuelle d'une petite protéine de liaison du GTP, Rabóp, dans la migration post-golgienne des vésicules à synaptophysine, au cours du développement neuronal, se sont poursuivies. A l'aide de méthodes convergentes — immunocytochimie, fractionnement, immunoprécipitation, immunoréplique — on montre une association transitoire de Rabóp et de la synaptophysine dans la membrane de vésicules post-golgiennes et de vésicules synaptiques. Ces résultats suggèrent un rôle de Rabóp à une étape précoce de la biogénèse des vésicules synaptiques (en collaboration avec B. GOUD, Institut Pasteur, soumis pour publication).

#### PUBLICATIONS

VIEAU D., TOUGARD C., ROSENBAUM E., LENNE F. and BERTAGNA X. (1991). *The secretory granule protein 7B2 is secreted in parallel with proopiomelanocortin and its end-products by the mouse corticotroph tumour cells AtT-20.* (*J. Neuroendocrinol.*, 3, 229-231).

LAVERRIERE J.N. (1991). *Régulation multigénique associée à la sécrétion de prolactine.* (*BIO-La lettre des Sciences de la Vie*, septembre 1991, p. 8).

KAGOTANI Y., PICART R., BARRET A., WIEDENMANN B., HUTTNER W.B. and TIXIER-VIDAL A. (1991). *Subcellular localization of Secretogranin II and Synaptophysin by immunoelectron microscopy in differentiated hypothalamic neurons in culture.* (*J. Histochem. Cytochem.*, 39, 1507-1518).

RICHARD J.L., LAVERRIERE J.N., BUISSON N., TIXIER-VIDAL A. and GOURDJI D. (1991). *Kinetics of TRH and 1,25 dihydroxyvitamin D3 (1,25.D3) interaction on the expression of PRL and GH genes in GH3B6 pituitary cells.* In : « Proceedings of the Eight Workshop on vitamin » Eds : A.W. Norman, R. Bouillon, M. Thomasset. Walter De Gruyter, Berlin, 1991, pp. 28-29.

GOURDJI D., LAVERRIERE J.N., PASSEGUE E., BUISSON N. et RICHARD J.L. (1991). *Régulations multigéniques et activité sécrétoire dans des cellules mammosomatotropes.* (*Ann. Endocrinol.*, 52, 11N).

NASCIUTTI L.E., PICART R., ROSEBAUM E., TIXIER-VIDAL A. and TOUGARD C. (1992). *Effects of reduced temperatures and Brefeldin A on prolactin secretion and on subcellular distribution of the secretory product and membrane antigens in GH3 pituitary cells. (Biology of the Cell, 75, 25-35).*

TIXIER-VIDAL A., BARRET A., FAIVRE-BAUMAN A., HUTTNER W. and WIEDENMANN B. (1992). *Differential expression and subcellular localization of secretogranin II and synaptophysin during early development of mouse hypothalamic neurons in culture. (Neurosci., 47, n° 4, 967-978).*

VILA-PORCILE E., PICART R., VIGNY M., TIXIER-VIDAL A. and TOUGARD C. (1992). *Immunolocalization of laminin, heparan-sulfate proteoglycan, entactin and type IV collagen in the rat anterior pituitary. I. An in vivo study. (Anat. Rec., 232, 482-492).*

VILA-PORCILE E., PICART R., VIGNY M., TIXIER-VIDAL A. and TOUGARD C. (1992). *Immunolocalization of laminin, heparan-sulfate proteoglycan, entactin and type IV collagen in the rat anterior pituitary. II. An in vitro study on primary cultures. (Anat. Rec., 233, 1-12).*

ROLAND J., GROUSELLE D., GOURDJI D., TIXIER-VIDAL A. and CAZENAVE P.A. (1992). *Properties of monoclonal antibodies to thyroliberin (TRH) induced by different immunogens : comparison with pituitary TRH receptor. (Molecular Immunology, 29, 4, 463-469).*

CROISSANDEAU G., PAGESY P., GROUSELLE D., LEDAFNIET M., PEILLON F. and LI J.Y. (1992). *Immunoreactive thyroliberin (TRH) precursor forms in human hypothalamus and anterior pituitary tissues. (FEBS Letters, 298, 2-3, 191-194).*

KAGOTANI Y., PICART R., BARRET A., WIEDENMANN B. and TIXIER-VIDAL A. (1992). *Effect of chemical depolarization on membrane recycling in hypothalamic neurons in culture. (Molecular and Cellular Neurosciences, 3, 291-304).*

#### CONGRÈS

Eight Workshop on Vitamin D, Paris, juillet 1991, J.L. RICHARD.

39th Annual Meeting of the European Tissue Culture Society, Cracovie, Pologne, 16-19 septembre 1991, D. GOURDJI.

XX<sup>e</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Genève, 18-20 septembre 1991. N. BRUNET DE CARVALHO, N. BUISSON, D. GOURDJI, D. GROUSELLE, A. TIXIER-VIDAL.

VIII<sup>e</sup> Journée de Génétique et Pathologie Moléculaire, ICGM, Faculté de Médecine, Cochin-Port Royal, 20 septembre 1991. A. BARRET, J.N. LAVERRIERE, E. PASSEGUE, A. TIXIER-VIDAL, E. VILA-PORCILE.

Colloque de la Société de Biologie Cellulaire de France : Cytosquelette et Communications Cellulaires, Rouen, 23-25 septembre 1991. N. BRUNET DE CARVALHO, A. MORIN, R. PICART, A. TIXIER-VIDAL, C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE.

10<sup>e</sup> Congrès Français d'Endocrinologie, Rouen, 26-28 septembre 1991. N. BRUNET DE CARVALHO, A. MORIN, R. PICART, J.L. RICHARD, A. TIXIER-VIDAL, C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE.

Philippe LAUDAT, Conférence « Oncogènes, suppressor genes and cell cycle control », Aussois, 6-10 octobre 1991, D. GOURDJI.

Colloque sur les Risques Biologiques en laboratoire de Recherche, Institut Pasteur, Paris, 18 et 19 novembre 1991. D. GROUSELLE, A. MORIN.

16<sup>th</sup> Gif Lecture in Neurobiology « Calcium and intraneuronal signalling », Gif-sur-Yvette, 5-6 décembre 1991. D. GOURDJI.

3<sup>e</sup> Congrès de la Société de Pharmacotoxicologie Cellulaire, Paris, 5-6 mars 1992. D. GOURDJI.

XXIII<sup>e</sup> Rencontre de Méribel, Les Arcs, 22-27 mars 1992, C. TOUGARD.

Conférence Jacques Monod : « Mechanisms of Exocytosis », Aussois, 11-16 mai 1992. C. TOUGARD.

16<sup>e</sup> Réunion du Groupe Développement « Manipulations du génome eucaryote : techniques et applications », Paris, 20-21 mai 1992, E. PASSEGUE.

Club Français de l'Hypophyse. Adénomes non fonctionnels. Faculté de Médecine Lariboisière Saint-Louis, Paris, 5 juin 1992. E. VILA-PORCILE.

#### SÉMINAIRES ET CONFÉRENCES

Laboratoire de Neurobiologie Physico-chimique, Directeur J.P. HENRY, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, 7 février 1992, C. TOUGARD.

Conférence au Laboratoire du Professeur HAMPRECHT, Göttingen, novembre 1991, A. TIXIER-VIDAL.

#### ENSEIGNEMENT

D. GOURDJI

— Modèles cellulaires « in vitro » : Application à l'évaluation des xénobiotiques. DESS Ecole Pratique des Hautes Etudes et Université Paris XII. Faculté de Médecine des Cordeliers, 4 heures, 29 janvier 1992.

— Module de Neuroendocrinologie Cellulaire, Maîtrise de Neurobiologie Cellulaire, Université de Paris VI, Faculté des Sciences, 12 heures de cours de mars à mai 1992.

— Certificat (C2) de Pharmacologie Endocrinienne, Faculté de Médecine Lariboisière-Saint-Louis, Université de Paris VII, 26 mai, 9 juin 1992, 3 heures.

J.N. LAVERRIERE et A. MORIN

— Ecole d'Automne de la Formation Permanente du CNRS, « Etude de l'expression de gènes d'eucaryotes » du 14 au 19 octobre 1991, Gif-sur-Yvette. Conférence et atelier pratique.

A. TIXIER

— DEA de Physiologie de la Reproduction, Paris VI, décembre 1991.

— DEA d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire, CHU Kremlin-Bicêtre, décembre 1991.

C. TOUGARD

— Cours dans le cadre des Certificats C2 et C'2 de Biologie Cellulaire et Moléculaire - Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales, Faculté de Médecine, Saint-Antoine, Paris VI, 23 janvier 1992.

— Séminaire méthodologique dans le cadre du DEA « Endocrinologie et Interactions cellulaires », CHU, Kremlin-Bicêtre, 7 mai 1992.

#### LISTE DES DIPLÔMES

##### DEA

Emmanuelle PASSEGUE - DEA d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Paris XI, septembre 1991.

##### THÈSES

Luiz Eurico NASCIUTTI - Thèse de Doctorat de l'Université de Paris VI, 12 novembre 1991.

Solange VAN DE MOORTELE - Thèse de Doctorat de l'Université de Paris VI, 20 décembre 1991.