

Biochimie Cellulaire

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

Résumé des cours 1992-1993 : Signaux et circuits régulateurs de la différenciation musculaire

Notre cours cette année a consisté en une analyse approfondie des principaux mécanismes de régulation et de signalisation intervenant dans les processus de différenciation musculaire (myogenèse).

Dans la première partie, nous nous sommes attachés à décrire les phases les plus précoces de l'embryogenèse au cours desquelles se forment les territoires où vont se manifester les premiers signes morphologiques et biochimiques de la myogenèse et où apparaîtront à plus ou moins long terme les premières cellules précurseurs du muscle, les *myoblastes*.

On sait que le tissu des muscles « squelettiques » dérive du mésoderme para-axial. Les étapes de formation du mésoderme, notamment chez l'oiseau, sont passées en revue et l'on étudie les réarrangements de la plaque segmentaire conduisant à l'apparition des somites ainsi que la compartimentation des somites en *dermomyotome* et *sclérotome* (qui aboutit à partir du dermomyotome à la diversification des myoblastes précurseurs des muscles des membres) le dermomyotome se différenciant en myotome où naissent les myoblastes qui sont à l'origine de la musculature du tronc.

Les facteurs induisant la formation *in vitro* du mésoderme à partir du tissu ectodermique (FGF, β TGF, activines) sont aujourd'hui bien caractérisés, mais certaines inconnues subsistent quant à leur mode et chronologie d'intervention *in vivo*. Parmi les premiers gènes qui semblent être stimulés par les activines le gène « Brachyury » a été sans doute le plus étudié. Son clonage et les études de sa séquence ont montré sa grande conservation chez les vertébrés. La mutation qui affecte ce gène chez la souris conduit à des altérations dans la formation de la notochorde et du mésoderme postérieur. Le produit du gène X-Brachyury du Xénope pourrait activer le gène XHox-3. Enfin l'injec-

tion de messenger X-Brachyury dans des coiffes ectodermiques (Caps) chez des embryons de Xénope en développement conduit à la formation ectopique de tissu mésodermique.

Le cours envisage après coup les caractéristiques et les rôles des principaux facteurs qui contrôlent le déroulement de la myogenèse proprement dite, après la formation du mésoderme. Les travaux classiques qui ont mis en lumière les rôles du facteur MyoD et des facteurs assimilés dans la différenciation musculaire de la souris sont rappelés. La protéine MyoD est un facteur de transactivation des gènes dont l'expression est liée au phénotype du muscle strié. Elle appartient à la catégorie des agents régulateurs à motif b-HLH (région basique, b, précédant dans la chaîne peptidique, une structure formée de 2 α -hélices séparées par une boucle). En se fixant à l'état d'un hétérodimère (MyoD-E12) à une séquence régulatrice appelée boîte E (CANNTG), la protéine MyoD entraîne une forte activation des gènes comportant cette séquence en amont de leur promoteur.

Les gènes régulateurs correspondants sont en nombre variable selon les espèces : tandis que les espèces animales inférieures (oursins, nématodes drosophile) ne comportent qu'un seul gène, on en compte 3 chez les oiseaux et 4 chez les mammifères (MyoD, myogénine, Myf5 et Myf6, alias MRF4). Il semble que le gène des muscles (*Caenorhabditis*) *hlh-1* qui code pour la protéine. Ce-MyoD représente le gène ancestral.

Tandis que des observations déjà anciennes indiqueraient que le seul motif bHLH suffit à convertir des cellules mésodermiques de la lignée 3T3 10T1/2 en myoblastes, des travaux plus récents qui ont été analysés indiquent que les domaines N et C terminaux jouent sans doute un rôle très important dans la *spécificité* d'action des divers facteurs myogéniques. La nature de ces domaines peptidiques influencerait sur les types de gènes « musculaires » qui sont stimulés dans des expériences de cotransfection. Le domaine N-terminal serait responsable des interactions qui s'établiraient *in situ* après attachement des facteurs myogéniques à la boîte E, entre ces facteurs et d'autres facteurs de transactivation (tel que MEF2) pouvant se lier à des séquences génétiques voisines.

Un autre aspect du mode d'action des facteurs myogéniques a été éclairé par des études récentes qui démontrent les antagonismes complexes pouvant s'exercer entre ces facteurs de différenciation et les produits des oncogènes. Ce point est capital si l'on veut comprendre les relations d'incompatibilité existant entre le cycle de division d'un myoblaste et le déclenchement de son programme de différenciation. On savait à cet égard que divers facteurs de croissance à effet mitogénique (ex : FGF, bTGF) contrecarrent les actions de différenciation des protéines MyoD ou assimilées. Plus récemment on a pu établir que, selon toute vraisemblance, ce sont les produits des gènes *fos* et *jun* qui interviennent, en tant qu'intermédiaires, dans cette action inhibitrice.

Les effets inhibiteurs marqués qu'exercent les facteurs *fos* ou *jun* vis-à-vis de l'action stimulatrice des protéines myogéniques, MyoD ou MRF4, ne relèvent pas d'une action de séquestration vis-à-vis du coactivateur E12, mais concernent l'interaction du motif bHLH avec la boîte E. C'est la fonction N-terminale de la protéine *fos* qui semble impliquer dans cette interférence, sans doute parce que *fos* empêcherait l'intervention d'un 3^e facteur agissant de façon coopérative.

Mais il existe sans doute d'autres mécanismes de verrouillage de l'action des facteurs myogéniques au cours de la division myoblastique. Par exemple, il a été montré que *jun* peut former directement un hétérodimère avec MyoD l'empêchant de s'associer avec le coactivateur E12. On possède également des évidences en faveur d'un mécanisme d'inhibition dans l'activité de MyoD, qui ferait intervenir la protéine kinase C et conduirait à la formation d'un dérivé phosphorylé inactif de ce facteur. Tous ces mécanismes qui concernent directement les facteurs myogéniques se surajoutent à des processus de verrouillage indirect par l'intermédiaire des facteurs Id lequel peut séquestrer transitoirement le coactivateur E12 et dont le gène est stimulé par SRF, une protéine présente dans le sérum.

Compte tenu de l'importance des facteurs à motif bHLH dans la régulation de la myogenèse, il était intéressant d'examiner à titre comparatif comment se présente la situation pour ce qui concerne l'existence de ces facteurs et leur ordre de formation au cours du développement chez différentes espèces. Nous avons donc passé en revue les étapes myogéniques dans des espèces aussi diversifiées que le nématode, la drosophile, le Xénope, les oiseaux ou les souris.

Rappelons qu'il n'existe qu'un seul gène régulateur bHLH du *Caenorhabditis*. Fait remarquable l'expression de ce gène (*hlh-1*) est décelable très précocement (stade 28 cellules) au cours de l'embryogenèse, au sein des noyaux des cellules musculaires striées de la paroi du corps (*body wall*) et dans leurs précurseurs. Toutefois, fait étonnant, lorsque le locus *hlh-1* comporte des délétions qui abolissent la formation de Ce-MyoD, les cellules musculaires de la paroi, continuent à apparaître en nombre correct, bien qu'elles comportent certaines anomalies dans l'organisation des myofilaments. On peut supposer soit l'existence d'une voie de myogenèse de substitution, qui n'emprunterait pas le relais de *hlh-1* soit, ce qui paraît moins vraisemblable, l'existence de réserves en messagers *hlh-1* maternel.

Chez la drosophile, on peut distinguer la myogenèse larvaire et la myogenèse propre au stade adulte. Deux gènes de régulation semblent intervenir au début de la myogenèse larvaire : *S59* et *nautilus* : l'un et l'autre codant pour un facteur de transcription. Le produit de *S59* est une protéine comportant un homéodomaine et est exprimé dans 3 des 30 muscles présents au sein de chacun des hémis-segments abdominaux et dans le système nerveux central.

Quant à la protéine, *nau* elle est l'homologue pour la drosophile du facteur MyoD et n'est exprimée elle aussi que dans un sous-ensemble de cellules de la musculature larvaire.

Les stades plus précoces de la myogenèse font intervenir plusieurs gènes : il existe un gène baptisé « dorsal » qui code pour un « morphogène » présent dans les cellules au stade précédant la formation du mésoderme. Ce morphogène active le gène *twist* dont l'action est requise pour stimuler plusieurs gènes intervenant dans la formation du mésoderme (tel que « snail »).

Il semble que la différenciation proprement musculaire dans la phase larvaire requiert l'arrêt dans l'expression du gène *twist*, dont le produit pourrait se comporter comme un régulateur négatif vis-à-vis du fonctionnement des gènes « musculaires ».

Chez l'oiseau (notamment le poulet et la caille) 3 gènes à motifs bHLH ont été caractérisés qui semblent correspondre aux facteurs MyoD MRF4 et Myf5. Il semble que la détermination myogénique dépende de la présence (et du fonctionnement) du tube neural, présence qui serait requise pour l'expression des 3 facteurs myogéniques correspondants. Enfin, chez la souris, des études approfondies mettant en œuvre les techniques d'hybridation *in situ* ont permis de retracer avec précision la chronologie d'expression des 4 gènes régulateurs codant pour des facteurs myogéniques à motifs bHLH. Deux points majeurs se dégagent de ces études.

En premier lieu il paraît clair que Myf5 agit comme le véritable facteur de détermination. Il est exprimé dans le dermomyotome avant même l'apparition des premiers myoblastes et son expression décroît par la suite.

En second lieu l'ordre d'apparition des 4 facteurs myogéniques n'est pas le même selon que l'on considère la formation des muscles du tronc ou celle des muscles de membres. Il se pourrait donc que la nature des combinatoires ainsi engendrées ou que les rapports quantitatifs existants entre les divers facteurs exprimés puissent contrôler les types de myogenèses qui se déroulent normalement chez un mammifère.

La dernière partie du cours a été consacrée à des travaux qui visent à préciser les modalités fonctionnelles des gènes régulateurs de type MyoD.

D'une part ont été examinés les résultats concernant l'emploi de recombinants entre la région régulatrice amont du gène MyoD et un gène « traceur », dans des expériences de transgénèse chez la souris. Ces résultats établissent l'existence d'une séquence « amplificatrice » (enhancer) spécifique qui permet l'expression sélective du gène MyoD dans la musculature striée et dans les tissus qui en sont les précurseurs.

D'autre part on s'est intéressé aux recherches récentes portant sur la mise

au silence élective des gènes MyoD ou Myf5 de la souris, grâce à la technique des recombinaisons homologues.

Contre toute attente, l'élimination du gène MyoD ou Myf5 chez des homozygotes résultant du développement d'embryons porteurs de cellules Es convenablement traités et du croisement en retour des hétérozygotes de première génération, n'abolit pas la myogenèse ! Tout au plus observe-t-on des retards dans l'apparition de la musculature (Myf5) et un arrêt dans la formation des « côtes »...

Ces résultats et leurs interprétations possibles ont été longuement exposés. Comme cela semble être le cas lorsque l'on élimine le gène *hlh-1* unique du *Caenorhabditis elegans* des phénomènes de substitution mobilisant des voies de myogenèse dépendant d'autres gènes régulateurs pourraient expliquer ces observations. Tout récemment, cependant, le laboratoire d'E. Olson a pu établir que la mise au silence du gène de la myogénine par recombinaison homologue contrairement à ce que l'on observe dans le cas des gènes MyoD et Myf5 bloquait de façon prononcée la formation de la musculature striée chez la souris.

Ainsi certains gènes de la « famille MyoD » tel le gène « Myogénine » ne pourraient être remplacés dans leur fonction en tant qu'éléments du contrôle myogénique naturel, tandis que d'autres (MyoD, Myf5) le peuvent. Ce degré variable de flexibilité fonctionnelle est peut-être lié à des degrés de spécialisation différentes qui seraient apparus au cours de l'évolution lorsque se sont formés, sans doute par duplication d'un gène primordial unique, les 4 gènes régulateurs de la myogenèse qui sont présents aujourd'hui chez les mammifères.

F.G.

SÉMINAIRES

Les séminaires du Professeur F. GROS ont été donnés en commun avec ceux du Professeur Nicole LE DOUARIN dont le cours portait sur des aspects voisins du nôtre puisqu'il concernait les mécanismes de la somitogenèse. Un colloque regroupant plus d'une vingtaine de séminaires, colloque intitulé « somitogenèse et myogenèse » a permis de réunir pendant plus de trois jours des spécialistes français et étrangers. Ce colloque a rencontré un très vif succès, il a été suivi par un très grand nombre de participants. Les Professeurs LE DOUARIN et GROS ont reçu de multiples témoignages de satisfaction tant des conférenciers que des auditeurs.

PROFESSEURS INVITÉS

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

D. BUICAN (Professeur à l'Université de Paris X-Nanterre ; Professeur associé à l'Université de Bucarest) : 1. *La théorie synergique de l'évolution de la sélection multipolaire*. 2. *Evolution synergique et théorie de la connaissance : Biognoséologie*.

C. CANTOR (Professeur à l'Université de Californie ; Berkeley. Directeur du Centre de biotechnologie de l'Université de Boston) : 1. *New approaches to genome mapping and sequencing*. 2. *Implications of the human genome project*.

M. Lev KISSELEV (Professeur à Engelhardt Institut de Biologie Moléculaire de Moscou, Membre de l'Académie des Sciences de Russie) : 1. *New strategy for genome mapping ; application to human chromosome 3*. 2. *Non-canonical functions and unusual features of mammalian aminoacyl-tRNA synthetases*. 3. *New approaches in analysis of transfer RNA-protein recognition : dry biochemistry aids wet biochemistry*. 4. *Mammalian genes : structural-functional aspects*.

D'autres professeurs ont donné un séminaire au laboratoire :

A. BASBAUM (University of California, San Francisco) : *Spinal cord mechanisms of pain control*.

M. BLUMENBERG (New York University Medical Center, USA) : *Regulation of keratin gene expression*.

P. COCHARD (Université P. Sabatier, Toulouse) : *Détermination des cellules gliales au cours du développement précoce du système nerveux central*.

J. EYER (Unité INSERM U298, CHRU Angers) : *Etude des neurofilaments par transgénie : Altérations du transport des neurofilaments et du diamètre axonal induites par l'expression de formes modifiées de la sous-unité lourde des neurofilaments (NF-H)*.

N. FAUCON BIGUET (Laboratoire de la Génétique de la Neurotransmission ; Gif-sur-Yvette) : *Tyrosine hydroxylase de rat : Régulation de l'expression du gène in vitro et in vivo*.

J. ILAN (Laboratory of Developmental Genetics and Molecular Biology ; Case Western reserve University, Cleveland, Ohio, USA) : *Cure of rat glioblastoma by episome-based antisense transcription of IGF-1*.

R. LIEM (Columbia University Department of Pathology, New-York) : *Developmental expression of neuronal intermediate filaments*.

R. MENA (Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados Del IPN, Mexico) : *New insights on the molecular pathology of the Alzheimer paired helical filaments.*

B.M. RIEDERER (Institut d'Anatomie, Faculté de Médecine, Université de Lausanne) : *The development of the neuronal cytoskeleton in the cat brain, and influence of phosphorylation.*

I. SILMAN (Department Neurobiology Weizmann Institut of Science Rehovot ; Israel) : *Studies on the three-dimensional structure of torpedo acetylcholinesterase.*

C. VESQUE (Laboratoire de Génétique Moléculaire ; Ecole Normale Supérieure) : *Facteurs de transcription à doigts à zinc et à homéodomaine impliqués dans la régionalisation du cerveau postérieur.*

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

L'adénovirus : vecteur de gènes dans les cellules neuronales et gliales du SNC en culture

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

Nous présenterons cette année un rapport correspondant à un aspect particulier de notre programme de recherche, réalisé en collaboration avec S. Akli et C. Caillaud de l'équipe du professeur A. Kahn. Nos travaux sur les canaux sodiques voltage-dépendants ont été poursuivis en parallèle.

La thérapie génique est une stratégie prometteuse, basée sur les techniques de biologie moléculaire, pour pallier les défauts de la structure ou de la régulation de l'expression de gènes impliqués dans certaines maladies génétiques. Cette approche consiste à introduire dans les cellules d'un organisme porteur d'un gène défectueux le gène normal correspondant dont l'expression permettra de corriger le défaut génétique. Le problème majeur auquel ont été confrontés les chercheurs dans ce domaine est celui du mode de délivrance de l'ADN thérapeutique. Des travaux très récents indiquent que l'adénovirus pourrait représenter un vecteur de choix pour transférer des gènes extrinsèques dans divers types de cellules somatiques y compris les cellules post-mitotiques réfractaires à la plupart des autres vecteurs. Ainsi, des constructions d'adénovirus recombinants non réplicatifs ont permis de délivrer des gènes, entre autres dans des hépatocytes et des myotubes ; leur expression s'est avérée stable.

Au cours de l'année passée, nous avons entamé un travail collaboratif pour déterminer si l'adénovirus pouvait également être utilisé comme vecteur de gène dans des cellules du SNC en culture. La construction utilisée a été

préparée selon la procédure décrite par Stratford-Perricaudet *et al.* (J. Clin. Invest., 1992, 90, 626). Il s'agit d'un adénovirus réplication-défectif contenant le gène LacZ de *E. Coli* dont l'expression à localisation nucléaire est sous le contrôle du LTR du virus du sarcome de Rous.

Des cultures de cellules neuronales et de cellules astrogliales issues de cerveau de rat ou de souris ont été infectées à différents temps en culture avec la suspension virale et la présence de l'activité β -galactosidase, codée par le gène Lac Z, révélée par une réaction cytochimique chromogène, pratiquée à des temps variables après infection. Des expériences de dose-réponse ont permis de définir la dose optimale de virus ($2-4 \times 10^8$ pfu/ml) permettant d'infecter jusqu'à 80 % des cellules neuronales et 100 % des cellules astrogliales, sans aucun effet cytopathique.

L'expression du gène transfecté est stable, les cellules exprimant toujours la β -galactosidase plus d'un mois après l'infection. Pour les neurones, l'infectabilité croît pendant les premiers jours de culture pour atteindre un plateau (80 % de cellules β -gal positives) au bout d'une semaine. Le pourcentage de cellules infectées se maintient à cette valeur pendant toute la durée de la culture (jusqu'à 4 semaines). Le haut degré d'infectabilité des astrocytes ne semble pas dépendre de leur degré de maturation phénotypique.

En conclusion, ces travaux indiquent que le vecteur adénoviral défectif permet le transfert et l'expression de gènes étrangers dans > 80 % des cellules du SNC en culture, les astrocytes étant plus susceptibles à l'infection que les neurones. Nos observations en culture ont été corroborées par une étude menée en parallèle *in vivo* par S. Akli *et al.* (Nature Genetics, 1993, 3, 224).

Etudes des interactions motoneurones cible musculaires

(B. CROIZAT, N. DEMIRKAPI, J.H. DI DONATO, M. BASSEVILLE).

Ce programme concerne l'étude des interactions motoneurone-cible musculaire et l'analyse des mécanismes moléculaires du dysfonctionnement dans certaines pathologies, telles que les amyotrophies spinales infantiles (AMS). Plus précisément, il s'agit d'initier une approche originale des interactions motoneurones-cible musculaire basée sur la comparaison des protéines extraites de moelle épinière et de muscle humains normaux et pathologiques. On peut ainsi espérer repérer la (ou les) protéine(s) correspondant au déficit moléculaire des amyotrophies spinales infantiles, maladies génétiques à transmission autosomique récessive, identifier des marqueurs du motoneurone humain et suivre leur évolution au cours de l'ontogénèse.

Les biopsies musculaires de biceps et les nécropsies de moelle épinière ont été obtenues avec l'accord du Comité d'Ethique de l'hôpital de la Salpêtrière (Paris) et le consentement éclairé des parents. Les échantillons étaient congelés immédiatement dans l'azote liquide. Les protéines des extraits tissulaires

ont été analysées par électrophorèse bidimensionnelle selon O'Farrell (1975) en utilisant un système Bio-Image 60S 2D. L'analyse informatisée des électrophorogrammes permet une délimitation précise des taches et leur comparaison quantitative.

Nous avons comparé les électrophorogrammes des protéines extraites de moelle épinière témoin et AMS. Nous avons repéré certaines protéines manifestant des variations significatives dans leur taux d'expression, notamment : 2 protéines a et b (126 kDa et 112 kDa) sont fortement surexprimées chez les AMS ($\times 7$) ; une protéine mineure c (35 kDa) n'est exprimée que chez les témoins. Inversement, 2 protéines d et e (24 kDa et 22 kDa) ne sont décelées que sur les électrophorogrammes d'extraits AMS.

On a comparé également les électrophorogrammes d'extraits de muscle témoin et AMS. On retrouve dans les extraits musculaires les protéines a et b (126 kDa et 112 kDa) également surexprimées chez le patient AMS ($\times 5$). La protéine f (30 kDa) n'est décelée que chez les témoins et 2 protéines g et h (23 kDa et 22 kDa) sont significativement moins exprimées chez les patients. Dans une publication soumise à la revue Neurologique, nous indiquons les masses moléculaires, points isoélectriques et intensités intégrales des protéines mentionnées et donnons sur des histogrammes une représentation graphique de l'expression différentielle de ces protéines chez les témoins et les patients AMS.

Ces résultats doivent être considérés comme préliminaires mais constituent, à notre connaissance, la première démonstration de changements dans le profil des protéines de la moelle épinière et du muscle, associés à l'amyotrophie spinale infantile.

Expression, structure et fonction des protéines microtubulaires

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

1. Polyglutamylation de la tubuline

La relation entre polyglutamylation (addition post-traductionnelle séquentielle de 1 à 6 unités glutamyles dans le domaine C-terminal des α et β -tubulines) et dynamique des microtubules a été analysée dans des neurones de cerveau de souris en culture primaire en utilisant des drogues affectant l'équilibre de polymérisation de la tubuline. Une activité déglutamylase a été mise en évidence : elle agit sur le polymère aussi bien que sur la tubuline libre, différant ainsi de l'activité glutamylase qui opère préférentiellement sur les microtubules. La résultante de ces activités et de leurs spécificités fait que le degré de polyglutamylation de la tubuline (nombre d'unités glutamyles) est

maximum sur le polymère (6 unités) et plus restreint sur la tubuline libre (3 à 4 unités). De plus, la vitesse à laquelle travaille la déglutamylase dépend de la longueur de la chaîne polyglutamylée : elle est rapide pour les unités glutamyles distales (4 à 6) et très ralentie pour les unités proximales (1 à 3).

2. Distributions tissulaire et sub-cellulaire de la tubuline glutamylée

Nous avons produit une série d'anticorps poly- et monoclonaux dirigés contre la tubuline glutamylée en utilisant comme immunogènes des peptides synthétiques modifiés chimiquement. L'utilisation de ces anticorps a permis de montrer que la polyglutamylation concerne la tubuline de tous les types cellulaires chez toutes les espèces animales testées (des protistes aux mammifères). Cependant, l'abondance de la tubuline polyglutamylée est très variable d'un type cellulaire à l'autre : elle est très élevée dans les neurones, faible dans les cellules gliales et encore plus faible dans les cellules non neurales. Dans le cervelet, une analyse immunocytochimique a montré que certains types neuronaux comme les cellules de Purkinje étaient particulièrement enrichis en tubuline glutamylée. Par des techniques d'immuno-marquage à l'or colloïdal en microscopie électronique (en collaboration avec J.P. Fouquet et M. Kann, Université Paris V), nous avons pu également montrer que la tubuline glutamylée était compartimentée dans les spermatides, c'est à dire concentrée dans les microtubules des centrioles et des axonèmes et absente dans ceux de la manchette.

3. Régulation des interactions entre les tubulines et les MAP's

Les microtubules sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires dont la médiation est assurée par les MAP's (protéines associées aux microtubules). Dans une même cellule, la coordination de ces différentes fonctions dans le temps et l'espace nécessitent une régulation à la fois très fine et très puissante capable de moduler de façon réversible les interactions entre les supports (microtubules) et les effecteurs (MAP's).

Les MAP's se lient aux domaines C-terminaux des tubulines, là où sont concentrées la diversité génétique et les modifications post-traductionnelles des tubulines. Ces observations suggèrent fortement que ces modifications pourraient représenter les éléments régulateurs des interactions entre les deux familles de protéines. Pour valider cette hypothèse, nous avons testé par des techniques de « Blot overlay » la qualité de liaison des protéines Tau avec les tubulines de cerveau. Il apparaît que les Tau's ne se lient pas aux produits primaires de tubuline et que leur affinité pour les tubulines modifiées varie en fonction du degré de modification de ces dernières : elle augmente progressivement dans un premier temps puis baisse ensuite, toujours progressivement, au niveau des isoformes de tubuline les plus acides. La polyglutamylation,

compte tenu de sa structure oligomérique, est un excellent candidat pour assurer ce rôle modulateur (des expériences préliminaires ont d'ailleurs montré qu'un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope de tubuline portant une chaîne polyglutamylée empêchait toute liaison avec les MAP's). L'optimum d'affinité correspond à des tubulines α ou β portant environ 3 unités glutamyles, ce qui représente le niveau de glutamylation faisant frontière entre les composants de vitesse lent et rapide de la déglutamylase. Ainsi, l'existence d'un frein cinétique à l'enlèvement rapide des unités glutamyles des tubulines se justifierait par la nécessité de laisser, dans la cellule, une réserve de tubuline libre possédant une compétence maximum pour de futures polymérisations de microtubules.

Expression et régulation des gènes de l'énolase au cours du développement

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

Notre groupe s'intéresse à la régulation de l'expression des gènes de l'énolase avec l'objectif global de contribuer à élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place et la stabilité du phénotype adulte des cellules nerveuses et musculaires. L'énolase est une enzyme de la voie glycolytique de structure dimérique formée à partir de trois types de sous-unités, codées par des gènes différents, d'expression spatio-temporelle spécifique : α (embryonnaire et ubiquitaire), β (spécifique des myofibres striées et des cardiomyocytes) et γ (spécifique des neurones). Les cinq isozymes caractérisés chez les Vertébrés Supérieurs ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$ et les hétérodimères $\alpha\beta$ et $\alpha\gamma$) ont des propriétés catalytiques identiques mais diffèrent fort probablement par leurs modalités d'interactions avec d'autres protéines contribuant à leur localisation subcellulaire ou à la formation de complexes multienzymatiques. Ainsi, les recherches que nous poursuivons concernent les mécanismes de la régulation différentielle des gènes α , β et γ au cours du développement mais également la spécialisation fonctionnelle des isozymes de l'énolase exprimés dans les cellules neuronales ou musculaires matures. Parmi les études récentes (dont les résultats ne figurent pas dans les articles parus cette année et indiqués dans la liste ci-dessous), nous évoquerons celles portant sur les trois points suivants :

1. *La distribution cellulaire des ARN messagers α et γ dans le cerveau de rat adulte.*

La présence d'environ 30 % d'hétérodimère $\alpha\gamma$ (il y a de bons arguments pour penser que cette forme hybride ne résulte pas d'un artefact d'extraction) dans les extraits de tissu cérébral adulte implique que certains groupes de cellules matures co-expriment les gènes α et γ . Ces cellules cependant n'ont

jamais été mises en évidence par les études immunohistochimiques : au stade adulte, la sous-unité γ n'a été observée que dans les neurones et α dans les astrocytes. A. Keller a étudié cette question en visualisant directement les ARNm α et γ sur coupes de cerveau de Rat adulte par hybridation *in situ* (collaboration avec A. Bérod, INSERM U339). Les résultats obtenus confirment l'origine spécifiquement neuronale de l'ARNm γ mais montrent également sans ambiguïté la co-localisation de transcrits α et γ dans certains groupes de neurones définis (Keller *et al*, en préparation). L'hétérodimère $\alpha\gamma$ est donc fort probablement d'origine neuronale et il sera intéressant de savoir si cet isozyme est transporté par le flux axonal lent jusqu'à la synapse comme c'est le cas pour $\gamma\gamma$. Il ressort également de cette étude que, selon les régions du cerveau, le gène embryonnaire α est la cible de signaux de régulation distincts au cours de la neurogenèse et l'un de nos projets immédiats est de cloner le gène α murin et ses régions régulatrices.

2. Les mécanismes de la régulation transcriptionnelle du gène de l'énolase spécifique du muscle strié (« gène β »)

Nos études précédentes en culture ont montré qu'il existe au moins deux régimes d'activité transcriptionnelle du gène β dans les cellules myogéniques : une activité basale dans les myoblastes prolifératifs et une activité forte dans les myotubes différenciés. Pour caractériser les séquences régulatrices impliquées nous avons effectué l'analyse fonctionnelle d'un ensemble de constructions chimériques incluant divers fragments génomiques (situés en amont du gène β ou intragéniques), par transfection transitoire dans des myoblastes, des myotubes et des cellules non musculaires. Il a été montré que la transcription du gène β dans les myotubes dépend d'une interaction entre le promoteur proximal et une séquence de 200 pb située dans le premier intron (S. Brosset *et al*, en préparation). Cette séquence intronique présente les propriétés d'un activateur (« enhancer ») musculaire et comporte des sites de fixation pour les facteurs nucléaires de la famille MyoD et de la famille MEF2 dont l'importance fonctionnelle est en cours d'analyse (travaux de K. Brodolin) par diverses techniques d'étude des interactions nucléo-protéiques.

3. La localisation chromosomique des gènes de l'énolase.

Les diverses sondes ADNc et génomiques que nous avons précédemment préparées ont permis la localisation chromosomique précise des gènes de l'énolase chez la Souris par la technique de croisements interspécifiques entre *M. spretus* et *M. musculus* C57BL/6J. ENO1(α), ENO2(γ) et ENO3(β) sont respectivement sur les chromosomes 4, 6 et 11, en accord avec les homologies connues entre chromosomes humains et murins. Les sondes exoniques ont également pu être utilisées pour préciser la localisation des gènes ENO

humains, précédemment déterminée par d'autres équipes, par hybridation *in situ* sur chromosomes (Sparkes *et al*, en préparation).

Mise en place du réseau de filaments intermédiaires dans différents types cellulaires. Régulation de l'expression de la périphérine.

(M.M. PORTIER, O. BOUSQUET, M. ESCURAT, M. FAUQUET, F. LANDON ; V. KARPOV : visiteur étranger)

Notre but est de comprendre le rôle de la périphérine dans les populations neuronales où elle est co-exprimée avec les protéines de neurofilaments. Au cours de cette année, nous avons entrepris une vaste étude de la mise en place du réseau de périphérine et de la régulation du gène de cette protéine.

1. *Mise en place du réseau de périphérine*

Nous avons déjà démontré que la périphérine est liée à la membrane nucléaire par l'intermédiaire de la lamine B et à la membrane plasmique par l'intermédiaire de l'ankyrine. L'étude de la mise en place du réseau, qui s'étend entre ces deux membranes, est en cours à l'aide d'expériences de transfection : l'ADNc de la périphérine est introduit dans différentes lignées cellulaires à l'aide d'un vecteur rétroviral. Les lignées cellulaires ont été choisies de façon à : 1) reproduire les types de co-expression observés *in vivo*, c'est-à-dire avec la vimentine (fibroblastes de souris) et avec les protéines de neurofilaments (cellules AtT20) ; 2) étudier la formation du réseau de périphérine *de novo*, c'est-à-dire dans des cellules n'exprimant aucune protéine de filament intermédiaire (fibroblastes de souris dans lesquels le gène de la vimentine a été inactivé).

Nous étudions d'autre part la participation des trois formes de périphérine, provenant de l'épissage alternatif du produit de transcription d'un gène unique, d'abord à la formation de filaments *in vitro* à l'aide de protéines synthétisées dans un vecteur d'expression, puis à l'assemblage des filaments en réseau dans divers systèmes cellulaires par des expériences de transfection.

2. *Régulation du gène de périphérine*

Nous avons déterminé le nombre et la position des sites hypersensibles à la DNAase I dans le gène de périphérine de souris. Ces sites correspondent aux lieux de fixation des protéines de régulation, et on sait que leur nombre et leur disposition changent lorsque le gène est activé.

Différentes lignées cellulaires de souris, dont le contenu en protéines de filaments intermédiaires a été vérifié au préalable sur gels de polyacrylamide en double dimension suivis de « Western blot », ont été analysées :

- des cellules de même origine embryonnaire (crête neurale) exprimant ou non la périphérine : neuroblastome, schwannome, mélanome ;
- des cellules qui n'expriment jamais la périphérine ;
- des cellules originaires des cellules β des îlots de Langerhans transformées à la suite de l'expression de l'antigène T de grande taille du SV40. Ces cellules sont considérées comme des cellules d'insulinome mais elles n'expriment pas la périphérine, contrairement aux cellules d'insulinome de rat RINSF.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

- dans les cellules de neuroblastome (NIE 115, N2a), le gène de la périphérine est transcrit activement et présente 9 sites d'hypersensibilité à la DNAase I, disposés dans la région promotrice et dans les introns I et III ;
- dans les lignées qui n'expriment jamais la périphérine, il existe un site fort, situé à 5,5 Kb du site d'initiation de la transcription, qui est par contre très faible dans les cellules de neuroblastome et qui pourrait donc être impliqué dans la répression du gène de la périphérine ;
- dans les lignées cellulaires de type « insulinome », la disposition des sites d'hypersensibilité est très voisine de celle observée pour les neuroblastomes, mais ici le site localisé à 5,5 Kb est très fortement marqué.

En utilisant la nucléase de microcoque, qui coupe entre les nucléosomes, nous avons observé une co-localisation des sites sensibles à la DNAase I et à cette nucléase ; les séquences régulatrices sont donc toujours accessibles aux protéines de régulation.

Les connaissances précises ainsi acquises sur la localisation des sites sensibles à la DNAase I nous permettent de réaliser diverses constructions afin d'étudier l'importance des différentes régions sur l'activité promotrice du gène.

Etude des décarboxylases des acides aminés et de la tyrosine hydroxylase
(J. THIBAUT, D. BOCHE, G. BRUNEAU, C. CHAMPSEIX, F. JEBAI, M. KRIEGER, C. VASSORT)

Au cours de cette année l'étude génétique de la DOPA décarboxylase (AADC), enzyme impliquée dans la synthèse des amines biogènes, la dopamine et la sérotonine, a été réalisée chez le rat et la structure de la partie amont de ce gène a été déterminée. Les deux régions contiguës à la séquence 5' des ARN messagers de l'AADC du rein et du cerveau ont été séquencées et analysées. La structure primaire a confirmé l'existence des deux promoteurs de l'AADC qui avaient été postulés. Des séquences consensus impliquées dans l'interactions avec des facteurs de transcription ont été identifiées.

Concernant cette même enzyme, le chromosome porteur du gène a été identifié chez le rat.

Une étude de l'expression de la protéine recombinante chez *E. coli* a permis la réalisation d'un sérum anti AADC qui réagit avec l'AADC de toutes les classes de vertébrés, depuis les poissons jusqu'à l'homme. Deux autres enzymes impliquées dans la synthèse de neuromédiateurs ont été étudiées : il s'agit des glutamate-décarboxylases impliquées dans la formation de l'acide γ amino butyrique (GABA) et l'histidine décarboxylase responsable de la formation de l'histamine. La localisation des chromosomes porteurs de ces gènes a été décrite chez le rat et a permis de définir des groupes de synténie et de déterminer la correspondance entre des parties de chromosomes humains et ceux du rat.

Enfin, le sérum anti tyrosine hydroxylase que nous avons réalisé précédemment nous a permis de poursuivre les collaborations engagées sur la localisation des neurones à TH dans l'encéphale de différentes espèces : le triton, le rat et le mouton.

Immortalisation cellulaire et marquage génétique. Gènes régulateurs de la division, de l'apoptose et de la différenciation

(P. ROUGET, R. BERNARD, I. BORDE, A. DO THI, E. DUPONT, C. EVRARD, E. GALIANA, M. LE BERT, B. SAMYN)

Nos recherches ont pour objectif général de contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires intervenant dans le contrôle de la division, l'apoptose et la différenciation des cellules nerveuses. Nous avons étendu à différentes catégories de cellules nerveuses issues de divers stades du développement, les travaux d'immortalisation cellulaire, que nous avons initié auparavant. Nous avons ainsi établi des lignées permanentes correspondant à diverses sous-populations cellulaires.

Ces lignées nous ont permis de développer un travail concernant l'identification, l'expression et le clonage de gènes codant pour des facteurs transcriptionnels susceptibles de réguler le cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Nous avons ainsi isolé un cDNA qui code pour une protéine comportant un domaine « Hélice-Loop-Hélice » et plusieurs sites consensus pour les MAP-kinases. Les résultats ont montré que ce cDNA (NPDC-1) est exprimé sélectivement dans les cellules nerveuses et que la protéine intervient dans le contrôle de la prolifération et le déclenchement de la différenciation terminale. La transfection de vecteurs eucaryotes dans diverses lignées cellulaires a montré que l'expression de NPDC-1 conduit à l'arrêt des divisions. Divers vecteurs inductibles, sens et anti-sens, sont en cours de construction. Ils seront

transférés d'une part dans des lignées cellulaires soit immortalisées, soit transformées, d'autre part dans la lignée germinale de la souris.

Une autre nécessité était d'obtenir un marquage génétique stable de sous-populations cellulaires définies, marquage permettant une détection *in situ* de l'expression de gènes étrangers introduits dans les cellules et autorisant donc le repérage de celles-ci, y compris en présence d'autres cellules. Le marquage de diverses catégories de cellules nerveuses, précurseurs et lignées permanentes a été effectué au laboratoire et ouvre de nombreuses perspectives d'étude *in vitro* ainsi qu'*in vivo*, après greffe de ces cellules chez l'animal : interactions, migrations, différenciation, contrôle de la prolifération.

Les vecteurs à expression ciblée que nous avons construits permettent de focaliser l'expression de l'oncogène immortalisant « grand T » (du polyome) et des séquences indicatrices nlslacZ dans divers précurseurs neuronaux ou gliaux. A l'aide de vecteurs chez lesquels ces deux gènes sont placés sous contrôle du promoteur « Neurofilament-L », nous avons maintenant obtenu plusieurs lignées de souris double-transgéniques. Leur étude a déjà montré une expression des transgènes dans les précurseurs neuronaux, avec une expression différentielle selon les stades du développement.

Nous avons également construit des vecteurs intégrant les séquences grand T (et tsa) par recombinaison homologue dans le gène homéotique Hox 3.1. Une partie de ce travail vise, en collaboration avec H.Le Mouellic et P.Brulet, à contribuer à l'étude du rôle de ce gène dans la différenciation. Une autre partie a pour objectif de « cibler » à la fois l'expression et l'intégration des gènes transférés afin de focaliser l'immortalisation et le marquage génétique en direction de précurseurs. Une autre perspective de ce système est l'étude de nouveaux modèles animaux de thérapie génique, basés sur le transfert de gènes fonctionnels, soit portés par des vecteurs viraux recombinants, soit associés à des constructions permettant un ciblage de l'intégration par recombinaison homologue.

Différenciation dans le tronc cérébral

(F. DE VITRY, J. CATELON, J. HILLION)

Nos travaux comprennent 2 parties : la première, effectuée en collaboration avec les équipes de J. Mallet (Gif/Yvette) et de M. Hamon (Pitié-Salpêtrière) a trait au rôle de la sérotonine dans la différenciation des neurones sérotoninergiques, et s'inscrit dans le cadre de la thèse de J. Hillion (1992) ; l'autre plus récemment abordée notamment grâce à notre intégration dans l'équipe de François Gros, porte sur les potentialités myogéniques de cellules cérébrales fœtales.

1. Recherche du mRNA du récepteur 5HT1A dans le tronc cérébral foetal du rat.

Le récepteur 5 HT1A, récemment cloné (Civelli, 1990) est considéré comme un autorécepteur puisqu'il a été localisé sur des ceps cellulaires de neurones sérotoninergiques dans le tronc cérébral (Pujol et coll. 1985, Sotelo et coll. 1990). Son rôle durant l'ontogénèse demeure à élucider.

Des recherches antérieures effectuées dans l'hypothalamus foetal de souris nous avait conduit à postuler un rôle de la sérotonine dans la différenciation de ses propres neurones.

Disposant d'anticorps spécifiques dirigés contre un épitope bien défini du récepteur (R) 5 HT1A ainsi que de sondes oligonucléotidiques appropriées, nous avons comparé les transcripts et le récepteur lui-même dans le tronc cérébral au cours de l'embryogénèse du rat.

Le profil temporel d'apparition des ARNm *in vivo* a été suivi de E 10 jusqu'à la naissance. Les essais standard de Northern blot se révélant insuffisamment sensibles pour la détection de ces très rares ARNm dans les tissus embryonnaires, l'expression du gène a été établie par la détection de son transcrit spécifique 5 HT1A mRNA grâce à la méthode de la PCR en utilisant comme amorces des oligonucléotides de 20 mers (amorce 5') et de 18 mers (amorce 3') comme décrit par Civelli (1990). La résolution à l'échelle cellulaire a été obtenue dans des cultures primaires de tronc cérébral initiées à partir d'embryons âgés de 12 à 15 jours, grâce à la double détection du messenger et de la protéine (sondes froides marquées à la biotine et immunohistochimie).

Spécificité cellulaire et expression temporelle du R 5 HT1A mRNA : nos résultats montrent que les messagers peuvent être détectés dès E 12 dans des cellules caractérisées morphologiquement et immunologiquement comme des neurones, 2 jours plus tard le récepteur est détectable en immunohistochimie. A E 12 le taux d'ARNm est très faible puis il augmente jusqu'à E 15 avant de s'éteindre temporairement à la naissance. L'expression du récepteur et de son ARNm semble restreinte à des cellules neuronales, en particulier des neurones sérotoninergiques.

Ces observations laissent penser que les neurones sérotoninergiques pourraient autoréguler leur propre développement, grâce à l'autorécepteur 5 HT1A.

2. Potentialités myogéniques de cellules foetales du tronc cérébral

De nombreuses cultures, initiées à partir du tronc cérébral sous-régions rostrales, caudales, dorsales et ventrales, et d'autres aires cérébrales, telles

l'hypothalamus, les hémisphères cérébrales, ont été réalisées suggérant que des cellules à potentialité myogénique soient présentes, à des fréquences variables, dans les différentes régions du cerveau.

La caractérisation de ces cellules myogéniques à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéines myofibrillaires spécifiques des muscles lisses et striés (squelettique et cardiaque) ou contre des constituants du cytosquelette (microfilaments, filaments intermédiaires) est largement réalisée et suggère une parenté étroite avec le muscle strié.

L'immunohistochimie actuellement mise en œuvre sur des coupes à congélation de cerveaux foetaux et néonataux devrait permettre de corrélérer les données obtenues en culture avec l'ontogénèse cérébrale.

L'immortalisation de ces populations myogéniques peu représentées au cours du développement foetal est en cours. D'ores et déjà les précurseurs issus du tissu nerveux apparaissent différents de ceux issus du mésenchyme voisin. Le clonage des populations encore hétérogènes sera le prélude à une meilleure compréhension de leur nature et de leur rôle.

Plusieurs questions fondamentales demeurent : les précurseurs sont-ils réellement d'origine neuroectodermique ou bien ont-ils colonisé le cerveau dès les premiers stades de l'embryogénèse, ainsi que peuvent le faire certains macrophages migrant depuis l'aire extra-embryonnaire vers le système nerveux ? Quelle parenté immunologique et biochimique ont-ils avec des cellules du système vasculaire cérébral foetal (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, péricytes) ? Les différents « marqueurs cellulaires » précédemment utilisés pourraient aider à remonter l'ontogénèse et identifier l'origine des précurseurs myogéniques cérébraux.

PUBLICATIONS

1992

K. ANDERSSON, C. VASSORT, B.A. BRENNAN, L. QUE, J. HAAVIK, T. FLATMARK, F. GROS et J. THIBAUT, *Purification and characterization of the blue-green rat phaeochromocytoma (PCI2) tyrosine hydroxylase with a dopamine-Fe (III) complex, reversal of the endogenous feedback inhibition by phosphorylation of serine-40 (Biochem. J., 284, 687-695, 1992).*

P. AUGUSTE, M. HUGUES, M. BORSOTTO, J. THIBAUT, G. ROMEY, T. COPPOLA, M. LAZDUNSKI, *Characterization and partial purification from pheochromocytoma cells of an endogenous equivalent of scyllatoxin, a scorpion toxin which blocks small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels (Brain Research, 599, 230-236, 1992).*

M. BATAILLER, D. BLACHE, J. THIBAUT, Y. TILLET, *Immunohistochemical colocalization of tyrosine hydroxylase and α estradiol receptors in the sheep arcuate nucleus (Neurosci. Lett., 146, 125-130, 1992).*

G. BRUNEAU, V.C. NGUYEN, F. GROS, A. BERNHEIM, THIBAUT J, *Preparation of a rat brain Histidine decarboxylase (HDC) cDNA probe by PCR and assignment of human HDC gene to chromosome 15 (Human Genetics, 90, 235-238, 1992).*

G. BRUNEAU, J. THIBAUT, F. GROS, M.G. MATTEI, *Mapping of the dopa decarboxylase gene to the 11A band of the murine genome (Biochem. Biophys. Res. Comm., 186, 926-930, 1992).*

C. CORIO, J. THIBAUT, J. PEUTE, *Distribution of catecholaminergic and serotonergic systems in forebrain and midbrain of the newt, Triturus alpestris (Cell. Tissue Res., Urodela, 268, 377-387, 1992).*

K. DOMANSKA-JANIK, B. DE NÉCHAUD, M. INOMATA, S. KAWASHIMA, T. ZALEWSKA, *Calcium-activated neutral protease (CANP) in normal and dysmyelinating mutant paralytic tremor rabbit myelin (Molec. Chem. Neuropathol., 16, 273-288, 1992).*

S. GAUTRON, G. DOS SANTOS, D. PINTO-HENRIQUE, A. KOULAKOFF, F. GROS, Y. BERWALD-NETTER, *The glial voltage-gated sodium channel: cell-specific and tissue-specific mRNA expression (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 7272-7276, 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, J. CHELLY, *Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75 kDa protein widely distributed in non-muscle tissues (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 7506-7510, 1992).*

A. KELLER, M.O. OTT, N. LAMANDÉ, M. LUCAS, F. GROS, M. BUCKINGHAM, M. LAZAR, *Activation of the gene encoding the glycolytic enzyme β -enolase during early myogenesis precedes an increased expression during fetal muscle development (Mechanisms of Development, 38, 41-54, 1992).*

J.C. LARCHER, M. BASSEVILLE, J.L. VAYSSIÈRE, L. CORDEAU-LOSSOUARN, B. CROIZAT, F. GROS, *Growth inhibition of N1E-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., 185, 915-924, 1992).*

J.C. LARCHER, D. BOUCHER, I. GINZBURG, F. GROS, P. DENOULET, *Heterogeneity of Tau proteins during mouse brain development and differentiation of cultured neurons (Dev. Biol., 154, 195-204, 1992).*

J.C. LARCHER, L. CORDEAU-LOSSOUARN, G. ROMÉY, F. GROS, B. CROIZAT, J.L. VAYSSIÈRE. *Adriamycin promotes neurite outgrowth in the « Neurite-Minus » N1A-103 mouse neuroblastoma cell line (Exp. Cell. Res., 203, 72-79).*

M. LUCAS, C. GOBLET, A. KELLER, N. LAMANDÉ, F. GROS, R.G. WALLEN, M. LAZAR, *Modulation of embryonic and muscle-specific enolase gene products in the developing mouse hindlimb (Differentiation, 51, 1-7, 1992).*

C. THIBIER, P. DENOULET, C. JESSUS, R. OZON, *A predominant basic alpha-tubulin isoform present in prophase Xenopus oocyte decreases during meiotic maturation (Biol. Cell, 75, 173-180, 1992).*

D. TORU-DELBAUFFE, D. BAGHDASSARIAN, D. BOTH, R. BERNARD P. ROUGET, M. PIERRE, *Effect of TGF- β 1 on the proliferation and differentiation of an immortalized astrocyte cell line: relationship with extracellular matrix (Exp. Cell. Res., 202, 316-325, 1992).*

M.F. TOURNIER, J. SOBCHAK, B. DE NÉCHAUD, M. DUGUET, *Comparison of biochemical properties of DNA-topoisomerase I from normal and regenerating liver (Eur. J. Biochem., 210, 359-364, 1992).*

J.L. VAYSSIÈRE, L. CORDEAU-LOSSOUARN, J.C. LARCHER, M. BASSEVILLE, F. GROS, B. CROIZAT, *Participation of the mitochondrial genome to the differentiation of neuroblastoma cells. In vitro (Cell. Dev. Biol., 28, 763-772, 1992).*

A. WOLFF, B. DE NÉCHAUD, D. CHILLET, H. MAZARGUIL, E. DESBRUYÈRES, S. AUDEBERT, B. EDDÉ, F. GROS, P. DENOULET, *Distribution of glutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335 (Eur. J. Cell Biol., 59, 425-432, 1992).*

Z.G. XUE, X.J. XUE, M. FAUQUET, J. SMITH, N. LE DOUARIN, *Expression of the gene encoding tyrosine hydroxylase in a subpopulation of dorsal root ganglion cells cultured in the presence of insulin or chick embryo extract (Dev. Brain Res., 69, 23-30, 1992).*

1993

S. AUDEBERT, E. DESBRUYÈRES, C. GRUSZCZYNSKI, A. KOULAKOFF, F. GROS, P. DENOULET, B. EDDÉ, *Reversible polyglutamylation of α - and β -tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons (Mol. Biol. Cell., 4 sous presse, 1993).*

C. BAUDOIN, G. MENEGUZZI, M.M. PORTIER, M. DEMARCHEZ, F. BERNERD, A. PISANI, J.P. ORTONNE, *Peripherin, a neuronal intermediate protein, is stably expressed by neuroendocrine carcinomas of the skin, their xenograft on nude mice, and the corresponding primary cultures (Cancer Res., 53, 1175-1181, 1993).*

M. BELTRAMO, M. KRIEGER, A. CALAS, M.F. FRANZONI, J. THIBAUT, *Aromatic L amino acid decarboxylase (AADC) immunohistochemistry in vertebrate brainstem with an antiserum raised against AADC made in E. coli, (Brain Res Bull., sous presse, 1993).*

N.A. BORISOVA, M.V. UGRUMOV, I.S. BALAN, J. THIBAUT, *Development of the tubero infundibular system in rats. Genesis of the tyrosine hydroxylase immunopositive neurons (Dev. Brain Res., sous presse, 1993).*

L. BOTTALICO, N. KENDRICK, A. KELLER, Y. LI, I. TABAS, *Cholesteryl ester loading of mouse peritoneal macrophages is associated with changes in the expression or modification of specific cellular proteins, including increase in an isoform of α -enolase isoform (Arteriosclerosis & Thrombosis, 13, 264-275, 1993).*

C. CAILLAUD, S. AKLI, E. VIGNE, A. KOULAKOFF, M. PERRICAUDET, L. POENARU, A. KAHN, Y. BERWALD-NETTER, *Adenoviral vector as a gene delivery system into cultured rat neuronal and glial cells (Eur. J. Neurosci, sous presse, 1993).*

E. DUPIN, M. MAUS, M. FAUQUET, *Regulation of the quail tyrosine hydroxylase gene in neural crest cells by cAMP and β -adrenergic ligands (Dev. Biol., sous presse, 1993).*

A. ESPINOSA DE LOS MONTEROS, R. BERNARD, B. TILLER, P. ROUGET, J. DE VELLIS, *Grafting of blue labelled glial cells into neonatal rat brain : differential survival and migration among cell types (Int. J. Dev. Neurosci., sous presse, 1993).*

M. FAUQUET, C. BONI, *The quail tyrosine hydroxylase gene promoter contains an active cAMP responsive element (J. Neurochem., 60, 274-281, 1993).*

J.P. FOUQUET, B. EDDÉ, M.L. KANN, A. WOLFF, E. DESBRUYÈRES, P. DENOULET, *Differential distribution of glutamylated tubulin during spermatogenesis in mammalian testis (Cell. Motil. Cytoskel., sous presse, 1993).*

E. GALIANA, R. BERNARD, I. BORDE, P. ROUGET, C. EVRARD, *Proliferation and differentiation properties of bipotent glial progenitor cell lines immortalized with the adenovirus E1A gene (J. Neurosci. Res., sous presse, 1993).*

J. HILLION, J.B. DUMAS MILNE-EDWARDS, J. CATELON, F. DE VITRY, F. GROS, M. HAMON, *Prenatal developmental expression of rat brain 5-HT1A receptor gene followed by PCR (Biochem. Biophys. Res. Comm., 191, 991-997, 1993).*

M. HOUDAYER, J.P. BOUVET, A. WOLFF, C. MAGNAC, J.C. GUILLEMOT, L. BORCHE, G. DIGHIRO, *Simultaneous presence, in one serum, of four monoclonal antibodies that might correspond to different steps in a clonal evolution from polyreactive to monoreactive antibodies (J. Immunol., 150, 311-319, 1993).*

V. KARPOV, F. LANDON, K. DJABALI, F. GROS, M.M. PORTIER, *Structure of the mouse gene encoding peripherin: a neuronal intermediate filament protein (Biol. Cell, 76, 43-48, 1993).*

M. KRIEGER, Y. TILLET, F. GROS, J. THIBAUT, *Preparation of an antiserum using a fusion protein produced by a cDNA for rat aromatic L-amino acid decarboxylase (Neurosci. Lett., 153, 88-92, 1993).*

P. MATHIAU, M. ESCURAT, P. AUBINEAU, *Immunohistochemical evidence for the absence of central neuron projection to pial blood vessels and dura mater (Neuroscience, 52, 667-676, 1993).*

Y. TILLET, M. BATAILLER, J. THIBAUT, *Neuronal projections to the medial preoptic area of the sheep, with special reference to monoaminergic afferents. Immunohistochemical and retrograde tract tracing studies (J. Comp. Neurol., 330, 195-220, 1993).*

Y. TILLET, J. THIBAUT, *Morphological relationships between tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons and dopamine-beta hydroxylase immunoreactive fibers in dopamine cell group A15 of the sheep (J. Chem. Neuroanat., 6, 69-78, 1993).*

M.V. UGRUMOV, A.P. POPOV, S.V. VLADIMIROV, S. KASMAMBETOVA, J. THIBAUT, *Development of the suprachiasmatic nucleus in rat during ontogenesis. Tyrosine hydroxylase immunopositive cell bodies and fibers Neuroscience, (sous presse, 1993).*

C. VASSORT, M. RIVIÈRE, G. BRUNEAU, F. GROS, J. THIBAUT, G. LEVAN, J. SZPIRER, C. SZPIRER, *Assignment of the rat genes coding for DOPA decarboxylase and glutamic acid decarboxylases (GAD 1 and GAG 2) (Mammalian Genome, 4-4, 202-206, 1993).*

B.E. WOJCIK, F. NOTHIAS, M. LAZAR, H. JOUIN, J.F. NICOLAS, M. PESCHANSKI, *Catecholaminergic neurons result from intracerebral implantation of embryonal carcinoma cells, (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90, 1305-1309, 1993).*

A. ZURN, M. FAUQUET, P. SHAW, J. KOCHER, *The neuropeptide VIP regulates the expression of the tyrosine hydroxylase gene in cultured avian sympathetic neurons (Mol. Brain Res. sous presse, 1993).*

THÈSE DE DOCTORAT

G. BRUNEAU, « *Structures et localisations chromosomiques de la DOPA décarboxylase de rat et de l'histidine décarboxylase humaine* », mai 1993 (Université Paris Val-de-Marne).

F. GOSSELIN, « *Expression des cytokératines dans des épithéliums gingivaux humains reconstitués in vitro par cultures cellulaires* », octobre 1992.

J. HILLION, « *Etude in vitro de quelques aspects du développement embryonnaire des cellules du système nerveux central de mammifères : Mise en place de neurones monoaminergiques, ontogénèse de deux lignages gliaux* ». Décembre 1992 (Université Paris VI).

M. LE BERT, « *Expression sélective d'un gène indicateur et d'un oncogène, au cours du développement de souris transgéniques. Clonage et Etude d'un nouveau gène régulateur de la prolifération et de la différenciation cellulaire* », décembre 1992 (Université Paris VI).

DIPLOMES D'ÉTUDES APPROFONDIES

M. LE GOFF, « *Caractérisation de la DOPA décarboxylase produite par des cellules chromaffines, ou par des cellules gliales infectées par un rétrovirus recombiné* », septembre 1992 (Université Paris VI).

B. SAMYN, « *Intégration d'un oncogène dans le génome de souris par transgénèse et recombinaison homologue. Construction d'un vecteur d'expression eucaryote* », octobre 1992 (Université Paris VI).

CONFÉRENCES, INVITATIONS, PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS

Le Professeur GROS a été co-organisateur avec le D^r G. BERNARDI du Colloque placé sous l'égide de l'UNESCO et de l'ICSU qui s'est tenu à l'occasion du 40^e anniversaire de la découverte de la double hélice par J. WATSON et F. CRICK. Ce colloque a réuni plus d'une trentaine de conférenciers de haut niveau dont 13 Prix Nobel.

A l'Académie des Sciences, il a également co-organisé avec son Président (le Professeur J. FRIEDEL) un colloque intitulé « Dynamique des systèmes biologiques ».

Il a prononcé deux conférences à l'École Française d'Athènes sur le thème « Récents progrès dans le domaine des maladies génétiques » après invitation de l'Ambassade de France.

Il a également participé au Congrès Européen de Biotechnologie en qualité de Vice-Président et il a été élu Président, en charge du futur Congrès Européen devant se tenir à Nice, en 1995.

M^{me} Y. BERWALD-NETTER a été invitée à donner des conférences dans le cadre de congrès : 1) *The glial Na-G channel — a new category within the voltage-gated Na channel family* au 3rd Rappaport Symposium, Haïfa (Israël ; novembre 1992). 2) *Primary structure, pharmacology and cell-type specificity of a novel sodium channel from brain astroglia* à la 26th Winter Brain Conference, Whistler (Canada ; janvier 1993). 3) *The glial voltage-gated Na-channel* à une Research Conference on Molecular Neurobiology (Crête ; avril 1993).

Elle a également donné un séminaire dans le Département de Physiologie, à l'Université Johns Hopkins, Baltimore (USA ; février 1993).

M. G. DOS-SANTOS a été invité à donner un séminaire : *Une nouvelle isoforme de canal Na voltage-dépendant- Na-G : Structure, spécificité d'expression cellulaire et tissulaire* à l'Hôpital Cochin dans l'Unité INSERM 129 (Paris ; juin 1992).

M. B. CROIZAT a participé au V^e Colloque National de l'Association Française contre les Myopathies. (Strasbourg ; juin 1993).

M^{me} N. DEMIRKAPI a donné un séminaire : *Variations dans l'expression des protéines de la moelle épinière et du muscle dans l'amyotrophie spinale infantile*. Service de Neuropédiatrie, Hôpital Bicêtre (Paris ; janvier 1993).

M. S. AUDEBERT a participé à la XIII^e Réunion du Club Français du Cytosquelette où il a présenté une communication : *Polyglutamylation et dynamique des microtubules* (Banyuls ; juin 1993).

M. P. DENOULET a donné une conférence sur *Les moteurs moléculaires des microtubules* (DEA de Biochimie, Paris VI ; mars 1993). Il a organisé la XIII^e Réunion Annuelle du Club Français du Cytosquelette qui s'est tenue au Laboratoire Arago (Banyuls ; juin 1993).

M. B. EDDÉ a participé au *Second International Symposium on Cell Motility* où il a présenté une communication : *Tubulin glutamylation and microtubule dynamics* (Sophia-Antipolis ; juillet 1993).

M. J.C. LARCHER a été invité à donner un séminaire *Analyse de l'hétérogénéité des tubulines et des protéines Tau dans le système nerveux*. IRSC (Villejuif ; septembre 1992). Il a également présenté une communication : *Implications des modifications post-traductionnelles de la tubuline dans la*

régulation des interactions tubuline — MAP lors de la XIII^e Réunion du Club Français du Cytosquelette (Banyuls ; juin 1993).

M^{me} A. WOLFF a donné un séminaire : *Etude de la polyglutamylation de la tubuline à l'aide d'anticorps poly- et monoclonaux*. Réunions Cytosquelette (Gif-sur-Yvette ; avril 1993). Elle a présenté une communication : *Polyclonal antibodies probing for the glutamylatable sequence of the tubulin carboxyterminal domain* à Madrid, lors du *Meeting of the European Cytoskeletal Club* (Madrid ; juillet 1992).

M^{lle} S. BROSSET a présenté une communication affichée : *Régulation transcriptionnelle du gène codant pour l'énolase spécifique du muscle strié* au V^e Colloque National de l'AFM sur les Maladies Neuro-Musculaires (Strasbourg ; juin 1993).

M^{me} A. KELLER a présenté une communication : *Multistep regulation of the murine β enolase gene* au XXI^e European Muscle Congress (Bielefeld, FRG ; septembre 1992).

M^{me} M. LAZAR a été invitée à donner une conférence : *Regulation of β -enolase gene expression during myogenesis in the mouse*. Séminaires des Chaires des Professeurs N. LE DOUARIN et F. GROS, Collège de France : *Les mécanismes de la différenciation cellulaire : somitogenèse et myogenèse* (Paris ; mars 1993).

Elle a également présenté un séminaire : *Régulation du gène de l'énolase- β au cours de la myogenèse chez la Souris*. Institut de Biologie Physico-Chimique (Paris ; mai 1993).

M^{lle} M. LUCAS a présenté une communication affichée : *Modulations of embryonic and muscle-specific enolase gene products in rat heart during ontogenesis and after pressure overload* au XXI^e European Muscle Congress (Bielefeld, FRG ; septembre 1992).

M. O. BOUSQUET a présenté deux communications : 1) *Expression of peripherin, a neuronal intermediate filament protein, in endocrine cells* au colloque de la Société de Biologie Cellulaire : *Compartmentation et Organisation Fonctionnelle des cellules Eucaryotes* (Lyon ; janvier 1993) ; 2) *Etude de la formation du réseau de périphérine et de son attachement à la membrane plasmique* au Club français du Cytosquelette (Banyuls ; juin 1993).

M^{lle} M. FAUQUET a été invitée à donner un séminaire : *Rôle des catécholamines dans la différenciation des sympathoblastes issus des cellules de crête neurale aviaire* à l'Institut Pasteur de Lille, laboratoire d'Oncologie Moléculaire (Lille ; mars 1993).

Elle a également présenté deux communications : 1) *Regulation of tyrosine hydroxylase in quail neural crest cells* au colloque de la Société de Biologie Cellulaire : *Compartmentation et Organisation Fonctionnelle des Cellules Eucaryotes*, (Lyon ; janvier 1993) et à la Gordon Conference : *Biological Structure and Gene Expression* (Volterra, Italy ; mai 1993).

M^{lle} F. GOSSELIN a présenté une communication : *Keratins as molecular markers for monitoring epithelial differentiation of in vitro human gingival epithelium* au 40th Meeting of the European Tissue Culture Society (Rennes ; juillet 1993).

M^{me} M.M. PORTIER a été invitée à donner trois séminaires : 1) et 2) *Peripherin and neurofilaments : expression and role(s) during the development*, l'un à l'Institut Polytechnique, Département de Biologie Cellulaire (Mexico ; 1993) et l'autre à l'Université Nationale Autonome, Département de Physiologie Cellulaire (Mexico ; mars 1993) ; 3) *Périphérine et neurofilaments : expression et rôle(s)* à l'UMR 9925 : *Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'embryogénèse* (Toulouse ; mai 1993).

Elle a également présenté deux exposés : 1) *Quel(s) rôle(s) attribuer aux filaments intermédiaires neuronaux ?* aux Journées de l'Institut de Biologie du Collège de France (Paris ; octobre 1992) ; 2) *Peripherin and neurofilaments : expression and role during neural development*, au colloque organisé par l'Académie des Sciences sur le thème : *Mécanismes du Développement* (Paris ; juillet 1993).

M^{me} M. KRIEGER a présenté quatre communications affichées : 1) *Mise en évidence de la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) chez différentes espèces de vertébrés à l'aide d'un sérum dirigé contre l'AADC produite chez E. coli* et 2) *Immunohistochimie de la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) dans le noyau suprachiasmatique du mouton avec un antisérum dirigé contre l'AADC de rat produite chez E. coli* au 1^{er} Colloque de La Société des Neurosciences (Strasbourg ; mai 1992) ; 3) *Aromatic aminoacid decarboxylase (AADC) immunoreactive neurons in the sheep hypothalamus demonstrated with an antiserum against rat AADC produced in E. coli* et 4) *Preparation of an antiserum using a fusion protein β -galactosidase-DOPA decarboxylase as immunogen* au 7th International catecholamine symposium (Amsterdam ; juin 1992).

M. J. THIBAUT a été invité à donner deux séminaires : 1) *Le gène de la DOPA décarboxylase* à la Pitié-Salpêtrière, M. HAMON (Paris ; octobre 1992) ; 2) *La DOPA décarboxylase, une protéine, deux ARNm, un gène*. Laboratoire de Neuroendocrinologie sexuelle, M. CHEMINEAU, (INRA, Nouzilly ; avril 1993).

Il a également présenté une communication : *Catecholaminergic innervation of the sheep diencephalon. Immunohistochemical study*. 7th International catecholamine symposium (Amsterdam ; juin 1992).

M. P. ROUGET a été invité à donner une conférence : *Gene expression during the development of the neural tube, in transgenic mice*. 9th Meeting Eur. Soc. Neurochem. (Dublin ; Août 1993).

M^{lle} R. BERNARD a présenté une communication affichée : *Temperature-*

sensitive glial cell lines, immortalized with a glio-targeted and conditional vector. 9th Meeting Eur. Soc. Neurochem (Dublin ; Août 1993).

M^{me} F. DE VITRY a participé à deux Congrès : 1) *Macrophages/microglia and Pathophysiology of CNS injuries in AIDS.* Agence Nationale de Recherche sur le Sida (ANRS), (Bougival ; mars 1993) ; 2) *Les mécanismes de la différenciation cellulaire : somitogenèse et myogenèse.* Collège de France (Paris ; mars 1993).

DISTINCTIONS

Le Professeur GROS a été nommé Conseiller spécial à la Commission des Communautés européennes en charge des questions se rapportant au domaine des Sciences de la Vie.

M^{lle} F. GOSSELIN a reçu le prix des Actualités Odonto-Stomatologiques décerné par l'Académie Nationale de Chirurgie dentaire, ainsi que le prix annuel du Comité Scientifique de la Fondation Yves Rocher.

GROUPE DE BIOLOGIE DE LA CELLULE NEUROENDOCRINE
URA CNRS 1115

Responsable : M^{me} C. TOUGARD, Directeur de Recherche, C.N.R.S.

L'objectif général des recherches réside dans l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans la sécrétion d'une hormone antéhypophysaire, la prolactine.

I. BIOLOGIE DU PROCESSUS SÉCRÉTOIRE DANS LA CELLULE À PROLACTINE
(C. TOUGARD, N. BRUNET DE CARVALHO, A. MORIN, E. VILA-PORCILE,
L. MULLER, H. OZAWA, A. BARRET, R. PICART)

Le processus sécrétoire est un phénomène hautement intégré, dynamique et compartimenté, dont les mécanismes de régulation sont encore mal connus et pour l'étude desquels la cellule à prolactine offre un modèle de choix. Au cours de l'année écoulée, nos recherches sont restées centrées, d'une part, sur les différentes étapes du transport intracellulaire de la prolactine, et d'autre part, sur le trafic membranaire qui lui est associé. La recherche d'éventuels signaux d'adressage sur la molécule de prolactine s'est poursuivie par une approche de transfection de différentes lignées de cellules eucaryotes avec un vecteur d'expression contenant la séquence ADN complémentaire de la prolactine de rat, native ou mutée. Nous nous sommes également attachés à comprendre la signification fonctionnelle de l'hétérogénéité morphologique des cellules à prolactine. Enfin, un nouvel axe de recherche a été abordé, en collaboration avec plusieurs laboratoires extérieurs : la recherche de protéines qui lient et hydrolysent le GTP, les protéines G (petites protéines G et protéines G hétérotrimériques), au niveau des compartiments membranaires impliqués dans le processus sécrétoire, protéines G qui seraient susceptibles de jouer un rôle dans la régulation du transport intracellulaire de la prolactine. L'ensemble de ces études a été réalisé sur deux modèles de cellules à prolactine en culture : les cellules à prolactine dans des cultures primaires de cellules antéhypophysaires de rat et des cellules à prolactine de rat en lignée continue, les cellules GH3B6.

Certains aspects de ces recherches ont donné lieu à mémoire ou à publication :

1. *Etude des différentes formes moléculaires de la prolactine au cours de son transport intracellulaire*

La prolactine, protéine de 23 Kd, subit une maturation post-traductionnelle à l'intérieur des cellules lactotropes de rat, mais on ne sait pas à quel niveau

du transport intracellulaire de l'hormone s'effectuent ces différentes étapes de maturation biochimique. Les résultats recueillis cette année par L. MULLER, en développant différentes approches biochimiques et morphologiques avec des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre la prolactine de rat et des traitements connus pour bloquer le transport de l'hormone à différentes étapes de son transit intracellulaire (NASCIUTI et al., 1992), suggèrent que les différentes formes moléculaires observées, aussi bien les formes dimériques que la prolactine glycosylée, apparaissent très tôt au cours du processus sécrétoire de l'hormone.

2. Analyse de l'hétérogénéité morphofonctionnelle des cellules à prolactine

Les cellules à PRL présentent à la fois une hétérogénéité morphologique au microscope électronique et une hétérogénéité fonctionnelle en conditions basales et en réponse à des agents stimulateurs ou inhibiteurs de la sécrétion. Différentes sous-populations de cellules à PRL ont ainsi pu être décrites dans l'hypophyse « in vivo », aussi bien qu'« in vitro ». Cependant, aucune corrélation directe entre les paramètres morphologiques et les paramètres fonctionnels n'a été établie jusqu'à présent. E. VILA-PORCILE a abordé cette analyse fine, en adaptant pour l'étude au microscope électronique une technique dite « reverse hemolytic plaque assay » (RHPA), qui permet d'analyser et de quantifier la libération hormonale à l'échelle d'une seule cellule. La mise au point de cette approche, en vue d'une analyse ultrastructurale des cellules sécrétantes individualisées, a permis à E. VILA-PORCILE d'entreprendre une exploration de la signification fonctionnelle de l'hétérogénéité morphologique des cellules à prolactine. D'ores et déjà, des informations ont été recueillies, démontrant que les cellules qui sécrètent peu en conditions basales seraient préférentiellement impliquées dans la réponse à un agent sécrétagogue stimulant, la thyrolibérine.

II. RÉGULATION NEUROENDOCRINE DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROLACTINE

(D. GOURDJI, J.N. LAVERRIÈRE, V. NGO, S. OUKHERFELLA, E. PASSEGUÉ, G. BOULLA, D. GROUSSELLE)

Notre objectif général est de comprendre les mécanismes par lesquels une cellule à prolactine intègre l'ensemble des facteurs régulateurs auxquels elle est soumise, les coordonne et les traduit en altérations de l'expression du gène de la prolactine ou de la sécrétion prolactinique. Ces deux paramètres font l'objet d'une régulation multifactorielle très complexe, mettant en jeu un grand nombre d'hormones, des messages d'origine nerveuse et des facteurs de croissance, agissant par des mécanismes intracellulaires très variés. A ce contrôle neuroendocrinien « classique », se superposent d'autres niveaux de

régulation, encore peu explorés, relevant de la complexité de la machinerie transcriptionnelle et de l'état du gène. C'est dans ce contexte que l'essentiel des recherches que nous avons réalisées s'est centré sur deux thèmes déjà initiés l'an passé. Le premier nous permet de poser la question de la mise en jeu des facteurs transcriptionnels ubiquitaires, rapidement inductibles par un grand nombre d'agents régulateurs, agissant à court ou à moyen terme. Le second prend en compte la structure de la chromatine et les modifications à long terme liées au cycle répliatif. Nous avons en outre conduit quelques investigations portant sur le récepteur au TRH. L'ensemble des expériences a été effectué à l'aide de lignées établies de cellules mammosomatotropes de rat de la famille « GH » caractérisées au laboratoire.

1. *Expression des proto-oncogènes nucléaires fos et jun*

Les familles des proto-oncogènes d'expression précoce *jun* et *fos* codent pour les constituants du facteur transcriptionnel ubiquitaire AP1, auquel on attribue un rôle de troisième messager, en participant aux mécanismes de transduction des signaux régulateurs depuis la surface cellulaire jusqu'au noyau. Nous avons précédemment montré que le neuropeptide TRH stimule de manière semblable et biphasique l'expression des oncogènes cellulaires d'expression précoce *jun B* et *c-fos* dans les cellules GH3B6 (voir notre rapport précédent). La mise en évidence d'une corrélation événementielle entre cette induction et d'autres effets du TRH étaye l'hypothèse d'une implication de l'hétérodimère Jun B/c-Fos dans la réponse sécrétoire et la stimulation du gène de la prolactine par ce neuropeptide. La spécificité de la réponse biphasique au TRH sur l'expression des oncogènes *jun B* et *c-fos* a été analysée à plusieurs niveaux. Ainsi, E. PASSEGUÉ a montré que le sérum, inducteur classique de ces oncogènes cellulaires, stimule aussi l'accumulation des mRNA *jun B* et *c-fos*, mais que cette induction se limite à un pic transitoire, sensiblement additif à l'effet précoce du TRH. D'autre part, l'induction du proto-oncogène *c-jun* par le TRH est inconstante, de faible amplitude et également limitée à un pic précoce. Enfin, ni le gène *fos B* ni le gène *jun D* ne sont induits.

D'autre part, l'ensemble des données recueillies sous l'action d'une variété d'inducteurs indique une spécificité d'expression et de régulation des différents membres des familles de gènes *fos* et *jun* dans les cellules antéhypophysaires GH3B6. On relèvera en particulier que *c-jun*, le composant majeur du complexe AP1, dans la majorité des modèles étudiés, apparaît très faiblement inductible dans ce modèle cellulaire.

2. Influence de l'état de méthylation de l'ADN sur l'activité de facteurs transcriptionnels intervenant dans la régulation de l'expression du gène de la prolactine

Ces recherches mettent à profit des résultats antérieurs montrant l'existence d'une corrélation entre l'état de méthylation du gène de la prolactine et son expression. Il repose : 1. sur la mise en œuvre de lignées cellulaires (GH3B6, GH3CDL et GH3AZA3) présentant, pour ce motif, une capacité variable à exprimer le gène de la prolactine, 2. sur l'identification de Pit-1/GHF1, une homéoprotéine indispensable à la différenciation des cellules lactotropes et somatotropes, également impliquée dans les étapes ultimes des effets transcriptionnels du TRH et du calcium.

Tout d'abord, des expériences de retardement de migration sur gel conjuguées à des expériences d'expression transitoire d'un gène artificiel pPRL-CAT transfecté ont permis à J.N. LAVERRIÈRE et V. NGO de montrer que le facteur transcriptionnel Pit-1 est présent et très probablement actif dans les trois lignées cellulaires étudiées. De plus, la comparaison de l'expression du gène endogène à celle du gène artificiel pPRL-CAT a permis de postuler l'hypothèse que la capacité d'activation du gène de la prolactine par le facteur Pit-1 est conditionnée par l'état de méthylation de l'ADN dans les conditions basales, comme sous stimulation par le TRH ou le calcium.

Une étude plus directe de l'impact de la méthylation de l'ADN a été ensuite développée par J.N. LAVERRIÈRE et V. NGO. Tout d'abord, l'influence de la méthylation d'un CpG adjacent au premier des sites de liaison du facteur Pit-1 sur le promoteur du gène de la prolactine a été analysée. Les observations recueillies indiquent que la méthylation de cette seule séquence est insuffisante pour rendre compte de l'inhibition de l'expression du gène de la prolactine. Par contre, la méthylation *in vitro* du gène artificiel pPRL-CAT par la CpG méthylase SssI, se traduit par l'abolition complète de l'expression du gène CAT, quelle que soit la lignée transfectée. Cette observation est en accord avec l'hypothèse d'un rôle déterminant de la méthylation de l'ADN dans l'expression du gène de la prolactine.

3. Recherche d'anticorps anti-idiotypiques dirigés contre le récepteur au TRH

D. GROUSSELLE avait précédemment obtenu, en collaboration avec J. ROLAND (Laboratoire de P.A. CAZENAVE, Institut Pasteur), un anticorps polyclonal (R38B12) dirigé contre des Igs anti-TRH. Selon la théorie anti-idiotypique, on pouvait espérer que ces Igs reconnaîtraient spécifiquement le récepteur au TRH. Rappelons que ce récepteur n'est toujours pas purifié et qu'il n'existe pas à ce jour d'anticorps antirécepteur au TRH caractérisé par les approches classiques. Des études immunocytochimiques, conduites à l'aide des Igs anti-idiotypiques R38B12 sur des cellules GH3B6 perméabilisées, ont été

analysées en microscopie confocale grâce à la collaboration établie avec A. ROUSSELET (CNRS, ENS Paris). Elles montrent la présence de matériel immunoréactif dans le cytoplasme et dans le domaine sous-membranaire des cellules GH3B6. Cette réaction immunologique est abolie par la présence de TRH. De même, une liaison atténuée par le TRH a été mise en évidence par des techniques biochimiques conduites sur des extraits cellulaires. Cependant, les Igs R38B12 ne permettent pas d'interférer avec les propriétés fonctionnelles du récepteur au TRH.

PUBLICATIONS

GOURDJI D., LAVERRIÈRE J.N., PASSEGUÉ E. et RICHARD J.L. (1992). *Hypophyseal cell model systems : the « GH » rat tumor-derived cell lines as a tool for the study of gene expression.* (*Cell Biology and Toxicology*, 8, 38-49).

TIXIER-VIDAL A., FAIVRE-BAUMAN A. et GOURDJI D. (1992). *La Thyréolibérine (TRH) In « Neuropeptides et Neuromédiateurs »* Coordinateur J. EPPELBAUM. (*Laboratoires Sandoz*, 247-255).

VAN DE MOORTELE S., PICART R., TIXIER-VIDAL A. et TOUGARD C. (1993). *Nocodazole and taxol affect subcellular compartments but not secretory activity of GH3B6 prolactin cells.* (*Eur. J. Cell Biol.*, 60, 217-227).

EBIOU J.C., GROUSSELLE D. et ARATAN-SPIRE S. (1992). *Anti thyrotropin-releasing hormone serum inhibits secretion of glucagon from isolated perfused rat pancreas : An experimental model for positive feedback regulation of glucagon secretion.* (*Endocrinology*, 131, 765-771).

NGO V.M., LAVERRIÈRE J.N., RICHARD J.L., PASSEGUÉ E. et GOURDJI D. (1992). *Regulation of prolactin gene expression in 5-azacytidine-treated rat pituitary cells.* (*Ninth International Congress of Endocrinology*, p. 539, septembre 1992).

TIXIER-VIDAL A., BARRET A., PICART R., MAYAU V., VOGT D., WIENDEMANN B. et GOUD B. (1993). *The small GTP-binding protein, Rab6p, is associated with both Golgi and post-Golgi synaptophysin containing membranes during synaptogenesis of hypothalamic neurons in culture.* (*J. Cell Science*, 106, 1-13).

BERTHERAT J., TIMSIT J., BLUET-PAJOT, MERCADIER J.J., GOURDJI D., KORDON C., EPPELBAUM J. (1993). *Chronic GH hypersecretion induces reciprocal and reversible changes in mRNA levels from hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin neurons in the rat.* (*J. Clinical Investigation*, 91, 1783-1791).

MORIN A. et TOUGARD C. (1993). *Régulation de la sécrétion de la prolactine de rat dans des cellules eucaryotes transfectées en culture*. (Annales d'Endocrinologie, 53, 2, p. 33N).

TOUGARD C. et TIXIER-VIDAL A. (1993). *Lactotropes and Gonadotropes*. Chapitre dans « *Physiology of Reproduction* » edited by E. KNOBIL and J.D. NEILL. (Raven Press, 2^e édition, sous presse).

VILA-PORCILE E., PICART R. et TOUGARD C. *Adaptation of the reverse hemolytic plaque assay to electron microscopy. A study of the individual secretory activity in prolactin cell subpopulations*. (J. Histochem. Cytochem., sous presse).

CONGRÈS

XIX^e Forum des jeunes chercheurs de la Société de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Université de Caen, 7-10 juillet 1992. E. PASSEGUÉ.

5th International Congress on Cell Biology, Madrid, 26-31 juillet 1992. N. BRUNET DE CARVALHO, C. TOUGARD.

9th International Congress of Endocrinology, Nice, 30 août-5 septembre 1992. E. VILA-PORCILE, D. GOURDJI, J.N. LAVERRIÈRE, E. PASSEGUÉ.

IX^e Journée de Génétique et de Pathologie Moléculaire. Institut de Génétique de l'Hôpital Cochin, Paris, 18 septembre 1992. D. GOURDJI, J.N. LAVERRIÈRE, E. PASSEGUÉ, V. NGO.

XXI^e Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Nancy, 23-25 septembre 1992. A. MORIN.

Journée Claude Bernard de la Société de Biologie. Biologie Cellulaire du Neurone. Paris, 25 novembre 1992. D. GOURDJI, C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE, A. MORIN, N. BRUNET DE CARVALHO, J.N. LAVERRIÈRE.

XVII^e Conférence en Neurobiologie. Mécanismes et régulations de la sécrétion des neurotransmetteurs. Gif-sur-Yvette, France, 3-4 décembre 1992. N. BRUNET DE CARVALHO.

Colloque de la Société de Biologie Cellulaire de France, Réunion de l'ATIP 3 du CNRS. Lyon-Villeurbanne, 11-14 janvier 1993. E. VILA-PORCILE.

3^e Congrès de la Société de Pharmacotoxicologie Cellulaire, Paris, 5-6 mars 1993, D. GOURDJI.

Journée d'échanges sur la Matrice Extracellulaire. Institut Pasteur, Paris, 15 mars 1993. E. VILA-PORCILE.

Club français de l'hypophyse. Les adénomes hypophysaires : aspects génétiques et relation avec les polyendocrinopathies de type I. Paris, 14 mai 1993. E. VILA-PORCILE.

Club des Modulateurs. Mécanisme d'action des hormones et des facteurs peptidiques et leurs modulateurs. Hôpital Bichat, Paris, mai 1993. D. GOURDJI, J.N. LAVERRIÈRE, E. PASSEGUÉ, V. NGO.

CO-ORGANISATION DE RÉUNIONS SCIENTIFIQUES

Co-organisation de Congrès : 40^e Meeting of the European Tissue Culture Society. Rennes, juillet 1993. D. GOURDJI.

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, janvier 1993.

— Module de Neuroendocrinologie Cellulaire, Maîtrise de Neurobiologie Cellulaire, Université de Paris VI, Faculté des Sciences : 10 heures de cours de mars à mai 1993.

— Certificat (C2) de Pharmacologie Endocrinienne, Faculté de Médecine Lariboisière-St-Louis, Université de Paris VII (3 heures, 7 et 14 juin 1993).

C. TOUGARD

— DEA de Physiologie de la Reproduction, Paris VI, 30 novembre 1992.

— DEA « Endocrinologie et Interactions Cellulaires », Paris XI, 6 mai 1993.

LISTE DES DIPLÔMES DEA

— Laurent MULLER - DEA Structure et Fonctionnement des Systèmes Biologiques Intégrés, Université de Paris-Sud, septembre 1992.

— Valérie NGO - DEA de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Paris VI, septembre 1992.

THÈSE

— Jean-Luc RICHARD - Thèse de Doctorat de l'Université Paris XI, Le Kremlin Bicêtre, 30 septembre 1992.