

Biochimie cellulaire

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

Résumé des cours 1993-1994 : Les moteurs moléculaires

Le cours a été consacré dans sa quasi-totalité à l'étude de ce que l'on est désormais convenu d'appeler « les moteurs moléculaires ». Il s'agit là, en effet, d'un domaine de la Biologie cellulaire et moléculaire qui est en pleine expansion. L'analyse des données relatives à ces fort curieuses protéines (souvent dénommées « mécano-enzymes ») revêt une grande importance car elle nous éclaire sur les mécanismes intervenant dans les mouvements intracellulaires, ceux qu'accompagne, en particulier, le transport des grosses molécules, des vésicules et d'une manière générale des corps figurés, vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule. Toutefois, nous avons mis un accent particulier sur les « moteurs » dont l'action s'accomplit au contact et le long des microtubules.

Dans le début des années 80, les biologistes possédaient maintes informations relatives à la contraction musculaire et aux phénomènes de battements ciliaires, mais n'avaient qu'une connaissance très approximative des mécanismes de la motilité cytoplasmique. On savait toutefois que les déplacements des chromosomes et des organelles membranaires s'effectuent au contact des microtubules et des microfilaments (ou filaments d'actine).

Une protéine responsable des forces de « glissement » des microtubules les uns par rapport aux autres intervenant par conséquent dans le battement des flagelles et des cils protéine douée d'activité ATPasique, la *Dynéine*, avait été découverte dans les cils des protozoaires du genre *Tetrahymena*, par Gibbons, en 1963. En outre, on connaissait les propriétés du complexe acto-myosinique, son rôle dans le glissement transversal, ATP dépendant, des filaments de myosine au contact du réseau indéformable des filaments d'actine, pendant la contraction musculaire. Par la suite, des molécules apparentées à la *Myosine* de muscle et à la *Dynéine* de l'axonème avaient été décrites dans une grande variété de cellules.

Les travaux réalisés au cours de cette décennie ont non seulement confirmé cette vue d'ensemble mais ils ont également établi que myosine cytoplasmique et dynéine flagellaire ne représentent en réalité que les membres, parmi d'autres, de familles extrêmement diversifiées de « moteurs moléculaires » agissant au niveau du cytosquelette.

Ainsi, à partir de 1990, on est parvenu à décrire l'existence de véritables super familles de myosines, kinésines, dynéines. L'importance de la motilité ayant pour support physique les microtubules a été mieux appréciée : en plus de leur fonction classique dans le battement des flagelles et des cils, les moteurs à support microtubulaire (dynéines, kinésines) apparaissent clairement impliqués aujourd'hui dans le « triage » intracellulaire des protéines, dans le remaniement des membranes, dans l'établissement de la polarité cellulaire (et la transmission synaptique) dans la séparation entre les éléments du fuseau achromatique, dans la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose ainsi que dans une grande variété d'autres processus.

La première partie du cours a été consacrée à un rappel sur les propriétés générales des microtubules, supports d'un véritable trafic intracellulaire de molécules et d'organelles. On a notamment insisté sur la polarité de ces éléments du cytosquelette dont l'assemblage implique une étape de nucléation à partir des centrosomes suivi d'un allongement par polymérisation des sous-unités (α et β tubulines), l'extrémité (+) se projetant du fuseau radial vers la périphérie. Le transport dirigé vers cette extrémité est donc centrifuge, celui qui admet la direction opposée (vers l'intérieur, ou extrémité (-)) étant centripète. Dans les neurones, les extrémités (-) des microtubules sont dirigées vers le corps cellulaire, les extrémités (+) vers les terminaisons de l'axone.

Le centrosome consiste en une paire d'éléments figurés, les centrioles, eux-mêmes composés de 9 triplets de microtubules, entourés par un matériel dense aux électrons : le matériel pericentriolaire osmiophile (OPM) qui sert de véritable site de nucléation dans la polymérisation des microtubules.

Après avoir rappelé les principales caractéristiques des MAP (microtubules associated proteins) dont certaines sont précisément de véritables mécano-enzymes, ainsi que le rôle du GTP dans l'assemblage dynamique des microtubules... etc., on a consacré une importante partie du cours aux propriétés de la γ tubuline, sous-unités récemment découverte par Oakley et Oakley en 1989. Cette découverte résulte de l'analyse du produit d'un gène d'*Aspergillus nidulans*, mip-A (mip = microtubule interacting proteins) qui s'est avéré présenter près de 40 % d'homologie avec les 2 autres sous-unités classiques des microtubules : l' α et la β tubuline. Par immunocytochimie, on a pu établir que la γ tubuline est presque exclusivement localisée au niveau des corpuscules polaires du fuseau achromatique (spindle pole bodies) de l'*Aspergillus*, ainsi que dans les centrioles des cellules de mammifères. Toute

une série d'arguments, notamment d'ordre génétique (ex. : étude des mutations mip-AD1 chez l'*Aspergillus*) suggèrent que la γ tubuline jouerait un rôle privilégié dans les premières étapes de l'assemblage des microtubules (nucléation). L'attachement de la γ tubuline des centrioles aux premiers dimères de tubuline en voie d'assemblage se ferait au niveau de la β tubuline.

La suite de ce cours a été consacrée aux caractéristiques des principaux moteurs moléculaires proprement dits.

Les *myosines* représentent les types de moteurs cellulaires les plus anciennement décrits. Leur existence et leurs propriétés n'ont été qu'évoquées puisque nous souhaitions nous attacher davantage aux moteurs à support microtubulaire. Il convient néanmoins de rappeler l'existence de plusieurs types de myosines cytoplasmiques telles : les *myosines-1* composées d'une seule chaîne à tête globulaire et d'une queue extrêmement courte qui jouent un rôle dans le transport des organelles et le remaniement de la membrane plasmique, la *myosine de la bordure en brosse* (Brush-border myosin ou BBM) également composée d'une seule chaîne à partie fibrillaire très courte, la protéine *nina-C*, de drosophile qui, contrairement aux autres molécules de myosines connues, comprend une tête globulaire à activité ATPasique, en position C-terminale, et une sérine-kinase en position N-terminale ; elle transporte cette sérine-kinase en des sites cellulaires spécifiques.

La *kinésine* est un moteur microtubulaire se déplaçant vers l'extrémité (+) du microtubule. Elle achemine donc les vésicules du centre vers la périphérie cellulaire. Les membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique sont équipées de ce type de moteur, ce qui explique leur étalement dans la cellule et leur redéploiement dans le cytoplasme après la mitose.

La première purification de la kinésine fut réalisée à partir du lobe optique de Calamar par Vale et coll., en 1985. Il s'agit d'un polypeptide de 110Kd, qui se fixe fortement aux microtubules en présence d'AMP-PNP (un analogue de l'ATP) et qui est naturellement associé à deux autres polypeptides de 65 Kd et 70 Kd. Des études ultérieures ont montré qu'elle comprend : deux chaînes lourdes (110 à 120 Kd selon les espèces) lesquelles comportent, comme les myosines-2 de muscle, deux parties globulaires N-terminales, génératrices de force mécanique en présence d'ATP, et des parties filamenteuses enroulées l'une autour de l'autre (α -hélices), ainsi que deux chaînes légères (62 à 70 Kd).

Lorsque des billes de latex sont imprégnées de kinésine et appliquées au contact des microtubules en présence d'ATP, la vidéo-microscopie démontre qu'elles se déplacent vers le pôle (+) à une vitesse de 0,3 à 0,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Si l'on recouvre une lamelle de microscope avec de la kinésine et qu'on y dépose des microtubules en présence d'ATP, on observe également un glissement par « reptation » de ces microtubules. La kinésine du cerveau de bœuf présente une très forte activité ATPasique activable par la présence de microtubules

($V_{\max} = 0,33 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ à saturation en tubuline). L'activité génératrice de force mécanique dépend de la concentration en ATP (K_{ATP} aux environs de $50 \mu\text{M}$).

Les activités motrices de la kinésine ne sont pas inhibées par la N-éthyl maleimide (NEM). Contrairement à la dynéine, la kinésine est assez peu sensible à l'effet des ions « Vanadate » (VO_4).

L'examen en microscopie électronique fait apparaître la kinésine comme un bâtonnet très allongé ($l = 80 \text{ nm}$) avec des formes spécialisées aux deux extrémités se présentant comme deux « gouvernails ». Les deux têtes globulaires ($9 \times 10 \text{ nm}$) sont clairement visibles.

La séquence complète de la kinésine a pu être déterminée à partir d'un clone de cDNA de drosophile. L'expression *in vitro* de portions tronquées de cette kinésine a indiqué que c'est bien la partie N-terminale qui est responsable de l'attachement (ATP dépendant) aux microtubules.

On a décrit depuis lors, toute une série de protéines très semblables à la kinésine de poisson ou de bœuf. Il s'agit par exemple des produits des gènes : KAR-3 (*Saccharomyces cerevisiae*), Bim-C (*Aspergillus nidulans*) et Ca^{nd} (*Drosophila melanogaster*). D'autres isoformes ont également été rapportées dans des extraits provenant de *Schizo-saccharomyces pombe* (cut-7), *Caenorhabditis elegans* (unc-104) et *Xenopus laevis* (Eg5).

Bien qu'on dénote peu de similitude dans les séquences de ces protéines en dehors des domaines « moteurs » (têtes globulaires N-terminales), la structure de la plupart de ces moteurs « présumés » s'apparente dans l'ensemble à celle de la kinésine classique. Plus récemment, les techniques d'amplification par PCR, et l'hybridation moléculaire semblent indiquer qu'un très grand nombre d'isoformes (peut-être jusqu'à 25 !) existerait en réalité chez la drosophile.

Tandis que la plupart de ces kinésines assurent le mouvement des organelles dans la direction antérograde (pôle +) ; il existe une exception à cette règle : le moteur dont la présence a été caractérisée, chez *Reticulomyxa* assure quant à lui un déplacement bidirectionnel des organelles. Après phosphorylation, la protéine catalyse un mouvement unidirectionnel vers le pôle (-).

En dehors des rôles très vraisemblables des kinésines dans le transport antérograde des vésicules, organelles ... etc, ces moteurs interviennent aussi dans le déplacement des chromosomes vers les pôles du fuseau au cours de l'anaphase (voir les travaux effectués sur les mutants Ca^{nd} et ncd^{D} , chez la drosophile).

Les dynéines sont des moteurs moléculaires qui assurent des déplacements microtubulaires au cours des battements ciliaires ou flagellaires (dynéines flagellaires) ou des transports d'organelles le long des microtubules (dynéines cytoplasmiques) dans la direction du pôle (-).

Le cours a d'abord fourni une description détaillée de l'organisation au demeurant assez complexe des dynéines flagellaires. Les doublets tubulaires des cils et des flagelles spermatiques contiennent trois formes de dynéines pontées dénommées bras, dont une forme de bras extérieur, et deux formes de bras intérieurs disposés sur la longueur du microtubule de façon régulière. Les bras extérieurs de dynéine flagellaire renferment chacun deux à trois sous-unités polypeptiques (appelées α , β et éventuellement γ) de masses moléculaires supérieures à 400 Kd ainsi qu'un certain nombre de sous-unités de masses inférieures. Le bras intérieur comprend en réalité deux à trois têtes globulaires reliées à une base commune par une tige unique. Ces têtes globulaires sont les véritables mécano-enzymes ATP dépendantes ; reliées aux microtubules par de petites projections flexibles de 10 nm, elles leur impriment des forces mécaniques à la manière d'une pompe à doigts et provoquent les glissements microtubulaires à l'intérieur de l'axonème qui sont à l'origine des battements.

Les dynéines flagellaires sont très sensibles à l'action du vanadate qui forme un complexe non hydrolysable : dynéine-ADP-vanadate. Par ailleurs l'irradiation aux UV (365 nm) de la dynéine en présence de vanadate et de MgATP (à des concentrations micromolaires) provoque une scission des chaînes de dynéine en un site bien défini avec perte d'activité ATPasique.

Les dynéines axonémiales forment, comme les kinésines, une famille multigénique hautement conservée. En 1987, Paschal, Sheptner et Vallee ont décrit une autre forme de dynéine, dite *cytoplasmique*, dans le cerveau de bœuf. Cette forme n'est autre que l'une des nombreuses protéines à haut P.M. que l'on trouve généralement associées aux microtubules et qui sont décrites de longue date sous le nom de MAP. La protéine MAPI-C s'est avérée posséder les caractéristiques d'une dynéine. Elle se dissocie des microtubules lorsque ces derniers sont préparés en présence de GTP, mais demeure à l'état combiné lorsque la purification des microtubules est réalisée en présence de Taxol. On l'en détache par l'addition d'ATP et on parachève la purification sur DEAE-sepharose et Biogel A-I.

MAP-1C présente une activité ATPasique stimuable par addition de microtubules. Elle permet le glissement unidirectionnel des microtubules sur lame de verre, en présence d'ATP (vitesse : $1,25 \pm 0,11$ mm/sec). D'après la direction empruntée on en déduit que MAP-1C se déplace le long des microtubules dans la direction retrograde [vers le pôle (-)]. Sa masse moléculaire est similaire à celle de la dynéine flagellaire, voisine de $1,2 \times 10^6$. Elle comporte 2 chaînes lourdes, 4 chaînes légères ayant des masses comprises entre 50 et 60 Kd plus 3 copies d'un polypeptide de 74 kD. Comme la dynéine axonémiale, la dynéine cytoplasmique est sensible au vanadate, quoiqu'à un moindre degré.

On a décrit plusieurs formes de dynéines cytoplasmiques après purification à partir des extraits cytosoliques de *C. elegans*, *Reticulomyxa*, *Dictyostelium*,

Paramecium, ou chez le calamar, etc.... Chez les mammifères, elle a été généralement extraite de foie de rat, ainsi que du cerveau ou des testicules. Son rôle est compatible avec celui d'un moteur intervenant dans le transport rétrograde.

La Dynamine, troisième type de protéine dont on a supposé qu'elle pouvait représenter une autre catégorie de moteur moléculaire, est une GTPase activable par les microtubules, protéine dont l'existence a été rapportée pour la première fois par Vallee et Shpetner en 1990. Elle appartient à la famille de protéines fixatrices de GTP dont les rôles physiologiques et les origines sont fort variés : Cette famille comprend les protéines inductibles par l'Interferon (MX) ; une protéine de levure jouant un rôle dans le triage vacuolaire et dans la séparation des corpuscules polaire du fuseau au cours de la méiose (VPS-I) ; ainsi qu'une protéine de *E.coli*, impliquée dans la répartition des chromosomes (MoKb). La dynamine de cerveau est un polypeptide unique de 100 Kd, renfermant un domaine globulaire N-terminal de 300 acides aminés, comprenant un site « consensus » pour la fixation de GTP et une région C-terminale pour la fixation aux microtubules.

Des études en microscopie électronique ont révélé que le polypeptide de 100 Kd induisait l'assemblage de plusieurs microtubules en faisceaux. Ces microtubules fasciculés sont reliés les uns aux autres par des ponts de dynamine régulièrement espacés et disposés de façon hélicoïdale le long de l'axe principal des microtubules.

En présence d'ATP, il se produit un glissement longitudinal de certains de ces microtubules associés à la dynamine. Mais, contrairement à ce que l'on observe avec la dynéine et la kinésine, la dynamine ne permet pas la reptation des microtubules *in vitro*. Alors que Vallee et al ont postulé un rôle en tant que mécano-enzyme un certain nombre d'observations se sont avérées en contradiction avec cette hypothèse. La distribution de la dynamine à l'intérieur des neurones n'est en effet guère compatible avec ce que l'on attendrait ; aucun transport vésiculaire ou de billes de latex n'est catalysé par la Dynamine... etc.

Selon les travaux réalisés tout récemment par des chercheurs du Skrips Research Center à la Jolla (USA), travaux dus à l'équipe de Shaffer et qui ont été analysés en détail, la dynamine interviendrait plutôt dans les processus d'endocytose GTP dépendante, en favorisant la formation de vésicules à partir des invaginations primaires de la membrane, appelées « coated pits ». Ceci résulte d'expériences de reconstitution où l'on a employé des extraits provenant de cellules normales, ou de cellules présentant des altérations au niveau du site fixateur de GTP dans la dynamine. Le rôle de la dynamine en tant que moteur moléculaire demeure donc controversé.

PROFESSEURS INVITÉS

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

H. GREEN (Professeur à Harvard Medical School, Boston, USA) : 1. *The keratinocyte as cultivable cell type and its use in the treatment of disease.* 2. *Involucrin as a substrate of transglutaminase and the unusual features of its evolution.* 3. *The involucrin gene and the problem of codon reiteration.* 4. *Basonuclin and its role in epidermal regulation.*

P. LACHMANN (Vice Président of the Royal Society, Directeur honoraire de l'Unité d'Immunopathologie moléculaire) : 1. *Complement deficiency and disease.* 2. *Complement lysis and protection against it.* 3. *Immunopathology, or how your immune system can damage your health.* 4. *Why do we have religions -considerations concerning men and bees.*

N. SHARON (Professeur au Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israël) : 1. *Neglected substances move to center stage.* 2. *Role in microbial infection.* 3. *Role in inflammatory diseases.* 4. *How carbohydrates bind to proteins.*

N. SUEOKA (Professeur à l'Université de Boulder, Colorado) : 1. *Biology — Differentiation of neural stem cells.* 2. *Molecular biology — Regulation of the expression of two glial genes (GFAP and S100b genes) in neuronal, glial and other cell lines originated from various tissues.*

D'autres professeurs ont donné un séminaire au laboratoire :

P. DENOULET (Collège de France, Paris) : *Polymorphisme fonctionnel des protéines microtubulaires : rôle des modifications post-traductionnelles de la tubuline dans le contrôle des interactions entre microtubules et MAPs.*

M. D. LAZAR (Collège de France, Paris) : *Régulation de l'expression des gènes codant les isozymes de l'énolase, marqueurs du développement des tissus nerveux et musculaire.*

J.F. LETERRIER (U298, CHRU d'Angers) : *Interactions in vitro entre éléments purifiés du cytosquelette axonal, neurofilaments et microtubules, et entre ces polymères et les mitochondries cérébrales isolées phénomènes ATP-dépendants et moteurs moléculaires*

F.L. MARGOLIS (Laboratory of Chemosensory Neurobiology, Roche Institute of Molecular Biology, Nutley, New Jersey) : *Regulation of olfactory neuron gene expression.*

J. NUNEZ (U292, Hôpital Henri Mondor, Créteil) : *Expression des protéines axonales tau et acquisition de la polarité neuronale.*

D. PAULIN (Service de Microscopie Electronique, Institut Pasteur) : *Cytosquelette et Différenciation*.

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Etudes des interactions motoneurone/cible musculaire

(B. CROIZAT, J.H. DI DONATO, S. BRAUN, P. KENNEL, D. BOUREME, P. POINDRON)

Le programme est effectué en collaboration avec le laboratoire d'immunopharmacologie du Professeur P. Poindron de l'Université Louis Pasteur à Strasbourg. Il 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). Les biopsies musculaires et les nécropsies de moelle épinière ont été obtenues avec l'accord du Comité d'Ethique de l'hôpital de la Salpêtrière (Paris) et les fœtus provenant d'IVG après avis favorable du Comité Consultatif National d'Ethique.

Le programme s'articule sur trois volets :

— Analyse des protéines — Recherche de différences dans l'expression de protéines susceptibles d'être corrélées au déficit moléculaire des AMS. Nous avons donc comparé en électrophorèse bidimensionnelle les profils des protéines humaines extraites de la moelle épinière et du muscle de sujets témoins et AMS. Nous avons trouvé des variations significatives qui ont été mesurées avec un système Bio-Image d'analyse informatisé. Notamment, les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène sont largement surexprimées dans les nécropsies et les biopsies des patients AMS. Nous abordons l'analyse des extraits cellulaires provenant de cocultures nerf-muscle.

— Etude *in vitro* — utilisation d'un système de coculture moelle épinière x cellules musculaires (rat/humain et humain/humain). Nous avons utilisé des biopsies musculaires provenant de sujets sains et de patients AMS. Les paramètres analysés : innervation des fibres musculaires et contractions, survie ou dégénérescence du système permettant de déterminer l'origine — nerveuse ou musculaire — du dysfonctionnement et d'étudier l'effet de différents facteurs neurotrophiques et myotrophiques.

— Etude *in vivo* — L'analyse comportementale et électromyographique de diverses souris mutantes considérées comme des modèles de la pathologie AMS, nous permet de retenir le modèle PMN (progressive motor neuropathy) pour les études pharmacologiques de facteurs et de molécules biologiquement actifs.

Expression, structure et fonctions des protéines microtubulaires

(Ph. DENOULET, S. AUDEBERT, D. BOUCHER, E. DESBRUYÈRES, B. EDDÉ, J.C. LARCHER et S. LAZEREG)

1. Structure de la chaîne polyglutamylée de la tubuline

La polyglutamylation est une modification post-traductionnelle consistant en l'addition séquentielle de 1 à 6 unités glutamyles sur un résidu glutamate du domaine C-terminal des α - et β -tubulines (E445 pour l'isotype $\alpha 1$ et E435 ou 438 pour les isotypes $\beta 2$ ou $\beta 6$). La première unité glutamyle (appelée $\gamma 1$) est liée par son groupement α -NH₂ au groupement γ -COOH du glutamate de la chaîne primaire et offre donc, théoriquement, deux possibilités pour lier l'unité suivante par branchement sur l' α - ou le γ -COOH (structure $\gamma 1\alpha 2$ ou $\gamma 1\gamma 2$). Grâce à l'utilisation d'anticorps polyclonaux monospécifiques, obtenus après immunisation avec des octapeptides synthétiques mono- ($\gamma 1$) et bi-glutamylés ($\gamma 1\alpha 2$ et $\gamma 1\gamma 2$), nous avons montré que les deux types de branchement existaient *in vivo* dans la tubuline de cerveau. En conséquence, l'hétérogénéité apportée par la polyglutamylation est capable d'engendrer plusieurs centaines d'isoformes distinctes sur le plan chimique et/ou stérique d' α - et de β -tubuline.

Des enzymes de glutamylation distinctes pourraient être impliquées dans la génération de ces deux types de branchement (voir § 2).

Enfin, une telle hétérogénéité chimique des domaines C-terminaux des tubulines pourrait se révéler indispensable dans la modulation qu'exerce la chaîne polyglutamylée sur la liaison des protéines associées aux microtubules (MAP's) (voir § 3).

2. Régulation différentielle de la polyglutamylation des α - et β -tubulines

Des expériences effectuées sur des neurones primaires de cerveau de souris, qui reproduisent fidèlement l'évolution de l'hétérogénéité de la tubuline observée *in vivo* au cours du développement, indiquent que la polyglutamylation des sous-unités α - et β -tubuline est régulée différemment. En effet, la sous-unité α -tubuline est rapidement polyglutamylée (jusqu'à 6 unités) dès le début de la différenciation neuronale. Par la suite, seul le taux global de modification de cette sous-unité augmente et, après 3 à 4 semaines de culture, pratiquement toutes les molécules d' α -tubuline sont modifiées. Par contre, pour la sous-unité β -tubuline, le niveau et le degré de polyglutamylation sont très bas dans les neurones embryonnaires et augmentent progressivement pendant toute la période de différenciation en culture. Dans les neurones matures, à l'image de ce qui est observé *in vivo*, une fraction importante de la sous-unité β -tubuline n'est pas glutamylée.

Compte tenu des différences importantes observées dans la régulation de la polyglutamylation des α - et β -tubulines et de l'absence apparente de motif

consensus de polyglutamylation dans les différents isotypes concernés, il est probable que des enzymes distinctes soient requises pour modifier chaque sous-unité, voire chaque isotype de tubuline.

3. Régulation des interactions entre isotubulines et MAP's : rôle de la polyglutamylation

Nous avons précédemment montré que la chaîne polyglutamylée de la tubuline était impliquée dans la régulation de l'interaction entre la protéine Tau et la tubuline. La longueur de la chaîne module l'affinité du domaine C-terminal de la tubuline pour la MAP. En effet, l'affinité relative de Tau est très faible pour des α - et β -tubulines non glutamylées. Elle augmente pour des tubulines portant de 1 à 3 unités glutamyles, passe par un optimum puis décroît pour des tubulines portant de 4 à 6 unités, les tubulines fortement glutamylées n'interagissant plus avec Tau. L'occultation de la chaîne polyglutamylée par l'anticorps monoclonal spécifique GT335 inhibe d'ailleurs complètement la liaison de Tau sur les deux sous-unités de tubuline.

Une protéolyse ménagée de la tubuline avec la subtilisine provoque une liaison constitutive de Tau. La subtilisine clive les domaines C-terminaux des α - et β -tubulines (10 à 15 acides aminés terminaux), entraînant la disparition de toute l'hétérogénéité de ces protéines et, en particulier, du site polyglutamylé. Ces expériences indiquent que les domaines C-terminaux non modifiés de la tubuline exercent une inhibition constitutive de la liaison des Tau. Cette inhibition est levée progressivement dans un premier temps par l'addition séquentielle des trois premières unités glutamyles puis restaurée progressivement dans un deuxième temps par l'addition des trois unités suivantes. De plus, comme ces expériences indiquent que Tau ne se fixe pas directement sur la chaîne polyglutamylée, il semble logique de penser que la modulation d'affinité exercée par cette chaîne est transmise indirectement via des changements conformationnels progressifs.

Régulation de l'expression différentielle des isozymes de l'énolase dans les tissus nerveux et musculaire

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

L'énolase appartient à une voie métabolique, la glycolyse, dont le rôle physiologique est critique dans les tissus nerveux et musculaire, notamment pour la survie et l'activité des neurones ainsi que pour la contraction des fibres striées rapides. De structure dimérique, l'énolase est formée à partir de trois types de sous-unités codées par des gènes différents : α (d'expression embryonnaire et ubiquitaire), β (spécifique des myofibres striées et des

cardiomyocytes) et γ (spécifique des neurones). Notre équipe s'intéresse aux mécanismes génétiques et épigénétiques impliqués dans la spécificité d'expression cellulaire des gènes de l'énolase ainsi qu'à la spécialisation fonctionnelle des diverses isoformes de cette enzyme. Nous avons cette année développé les deux thèmes suivants :

1. *Expression et régulation des isozymes de l'énolase in vivo dans les muscles striés*

1. A) Influence des hormones thyroïdiennes (HT) sur la mise en place et le maintien de l'expression des gènes α et β dans les muscles squelettiques et cardiaque chez la souris.

Nos résultats antérieurs conduisent à supposer un rôle (direct ou indirect) des HT dans l'expression du gène β -énolase. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante à tester qu'il y a des arguments en faveur d'un rôle des HT dans la coordination de l'expression des protéines sarcomériques et des protéines du métabolisme énergétique. Nous avons dans un premier temps examiné l'effet d'une thyroïdectomie chez la souris adulte : l'expression des ARNm α et β n'est pas altérée dans divers muscles squelettiques examinés ; par contre, dans le muscle cardiaque des mêmes animaux, on observe une chute importante du niveau d'ARN β . Une étude complémentaire est en cours pour analyser les conséquences d'une augmentation anticipée du niveau sérique d'HT, obtenue par injection d'HT à la naissance, sur l'expression des transcrits et des sous-unités de l'énolase et celle de plusieurs marqueurs sarcomériques pendant le développement post-natal des muscles des membres inférieurs et du cœur.

1. B) Influence de l'hypertrophie cardiaque

Le cœur de rat soumis à une surcharge hémodynamique par sténose aortique thoracique subit une diminution adaptative de sa vitesse de contraction accompagnée de modifications dans l'expression des isoformes de protéines de l'appareil contractile. La sténose provoque une diminution rapide du niveau d'ARN et de protéine β -énolase mais le niveau d'ARN α reste stable. Par contre, plus tardivement, on observe une augmentation de la quantité de sous-unité α -énolase et d'activité enzymatique dépendante de cette sous-unité. Une étude immunohistochimique est en cours pour caractériser les types cellulaires impliqués dans cette augmentation. (Collaboration avec les équipes de K. Schwartz et L. Rappaport, INSERM U153 et U127).

2. *Mécanismes de la régulation transcriptionnelle du gène β -énolase*

Nous avons précédemment cloné le gène codant l'énolase spécifique du muscle strié (β -énolase) et identifié dans le premier intron une région amplifi-

catrice (« enhancer ») de 200 pb essentielle pour l'activité du gène dans des cellules myogéniques différenciées en myotubes. Nous avons cherché à identifier les séquences qui interagissent spécifiquement avec des protéines nucléaires, dans cette région intragénique ainsi que dans une région amont promotrice d'environ 100pb, par les techniques d'empreinte à la DNaseI et de retard sur gel. Les résultats obtenus par ces techniques et par analyse délétionnelle indiquent que l'activité transcriptionnelle maximale du gène β requiert l'interaction de plusieurs types de facteurs nucléaires, en particulier ceux appartenant aux familles MEF2, MyoD et NF1. La cartographie des sites d'hypersensibilité de la chromatine à la DNaseI (HSS) suggère que les régions étudiées sont effectivement impliquées dans des interactions nucléo-protéiques *in vivo*. La recherche des éléments de séquence régulateurs se poursuit dans une région amont plus distale (à environ moins 600pb) où se trouvent un autre HSS ainsi que des motifs d'ADN susceptibles d'intervenir dans l'expression du gène β dans les myoblastes prolifératifs.

Mise en place du réseau de périphérine dans différents types cellulaires. Régulation de l'expression de la périphérine. Identification d'une protéine impliquée dans la différenciation.

(M.M. PORTIER, M. BASSEVILLE, O. BOUSQUET, D. CHILLET, K. DJABALI, M. FAUQUET, F. LANDON, M.J. LECOMTE, B. DE NECHAUD, A. WOLFF)

Nous avons poursuivi les travaux sur la mise en place du réseau de périphérine et sur la régulation du gène de cette protéine à l'aide des outils mis au point pendant l'année précédente. De plus, nous avons entrepris d'identifier les protéines auxquelles la périphérine s'associe. Enfin, au cours des très nombreuses analyses de cultures de lignées cellulaires et de tissus embryonnaires et adultes destinées à déterminer la spécificité d'expression de la périphérine, notre attention a été attirée par une protéine exprimée de façon importante et ubiquitaire chez l'embryon et très faiblement par contre chez l'adulte ; nous cherchons à l'identifier.

1. *Mise en place du réseau de périphérine*

Trois types d'études ont été réalisées : a) la mise en place du réseau de périphérine dans des cellules exprimant ou non d'autres protéines de filaments intermédiaires. Dans tous les cas, le réseau se met en place à partir de filaments de périphérine qui se polymérisent dans le cytoplasme sans localisation préférentielle ; b) l'influence des deux autres réseaux cytosquelettiques (microfilaments et microtubules) sur la mise en place du réseau de périphérine (et sans doute sur les réseaux de filaments intermédiaires en général). Nous avons observé que le réseau de périphérine ne peut se mettre en place que lorsque les réseaux de microfilaments et de microtubules sont intacts ; 3) la

mise en réseau éventuelle des isoformes minoritaires. Les trois formes de périphérine proviennent de l'épissage alternatif du produit de transcription d'un gène unique. La forme majoritaire de 58 kD et la forme minoritaire de 56 kD peuvent toutes deux former un réseau. Par contre, la forme minoritaire de 61 kD qui a conservé un intron et qui par suite possède une séquence supplémentaire de 32 acides aminés dans le domaine central en α -hélice, essentiel pour la formation des filaments, semble former des agrégats dans le cytoplasme. Elle est d'ailleurs présente essentiellement dans la fraction soluble d'un extrait cellulaire.

Nous savons déjà que la périphérine est liée à la lamine B, protéine de filament intermédiaire nucléaire, et à la membrane plasmique par l'intermédiaire de l'ankyrine. Nous recherchons à présent les protéines associées à la périphérine. Pour cela, les différentes formes de périphérine sont produites par génie génétique et couplées à des colonnes de sépharose. Le passage, à travers ces colonnes, d'extraits nucléaires et cytoplasmiques provenant de différents types cellulaires permet d'isoler des composants se liant aux isoformes ; leur identification est en cours.

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

L'analyse des sites d'hypersensibilité à la DNase I nous a révélé la présence de régions hypersensibles en amont du site d'initiation de la transcription ainsi que dans les régions introniques. Nous avons réalisé diverses constructions qui nous permettent d'étudier l'importance des différentes régions sur l'activité promotrice du gène : des fragments de promoteur ont été clonés en amont d'un gène rapporteur codant pour la luciférase, enzyme dont l'activité très forte permet des dosages particulièrement sensibles. Les régions hypersensibles situées dans les introns I et III ont également été isolées et introduites ou non dans les vecteurs précédents.

Au moyen de ces diverses constructions, nous cherchons à déterminer les sites d'action de divers facteurs neurotrophiques (NGF, LIF, CNTF, etc.). Nous savons déjà que deux d'entre eux agissent sur la synthèse de la périphérine : en effet, nous avons montré que le NGF provoque une augmentation de la synthèse de périphérine ; quant au LIF, il induit cette synthèse dans les neurones de l'hippocampe et dans les cellules AtT20.

3. Identification d'une protéine impliquée dans la différenciation

Cette protéine est très abondante dans les tissus embryonnaires ; elle disparaît progressivement chez l'adulte. Elle est exprimée dans toutes les lignées cellulaires que nous avons analysées. De plus, dans les lignées utilisées comme modèles neuronaux (NIE 115 de souris, PC 12 de rat), sa quantité diminue lorsque les cellules se différencient.

Le microséquençage de deux peptides internes (J.C. Guillemot, Sanofi, Toulouse) a permis de mettre en évidence une forte homologie avec une protéine humaine de même taille et dont la spécificité n'est pas connue. A l'aide du cDNA de la protéine humaine donné par Bent Honoré (Aarhus, Danemark), nous clonons actuellement la protéine de souris à partir de la banque de cDNA de NIE 115 qui avait été préparée pour le clonage de la périphérine.

Etude de la tyrosine hydroxylase et des décarboxylases conduisant à des neuromédiateurs

(J. THIBAUT, D. BOCHE, G. BRUNEAU, C. CHAMPEIX, F. JEBAI, M. KRIEGER, Y. TILLET, C. VASSORT)

1. *Clonage de la Tyrosine Hydroxylase (TH) de mouton*

La TH est l'enzyme clé de la synthèse des catécholamines, elle est le siège de l'ensemble des régulations de la voie catécholaminergique. Son ADNc et son gène ont été les premiers parmi les marqueurs neuronaux à faire l'objet d'études par génie génétique. La TH du rat et de l'homme sont déjà bien connues ; depuis ces travaux de pionniers, la séquence nucléotidique de plusieurs autres espèces a été déterminée. La comparaison de ces séquences a révélé un important pourcentage d'identité. Si la structure protéique est suffisamment conservée pour qu'un anticorps anti TH de rat reconnaisse l'enzyme de pratiquement toutes les espèces, l'identité des séquences nucléotidiques de petites tailles n'existe pas dans tous les cas, notamment chez le mouton. Cet animal constitue un modèle particulièrement original pour étudier les mécanismes de reproduction saisonnière, cet intérêt étant accru par le rôle qu'il joue dans les chaînes alimentaires. L'étude de ce ruminant devrait permettre d'éclaircir les relations qui s'établissent entre les systèmes hormonaux et catécholaminergiques en fonction des rythmes diurnes ou des cycles saisonniers.

A partir des ARN messagers extraits des glandes médullo-surrénales du mouton, nous avons préparé une banque d'ADNc dans le phage λ gt11, cette banque a été analysée et criblée en utilisant le sérum anti TH de rat que nous avions préparé au laboratoire. Les clones positifs ne contenant pas la région 5' de l'ARNm, en nous appuyant sur l'identité importante observée entre la séquence de TH de bœuf et celle du mouton, nous avons reconstruit cette séquence par PCR.

Le clone complet et la séquence codante entière du mouton seront ainsi reconstitués et fourniront des sondes spécifiques pour suivre, sur le plan qualitatif les synthèses et les accumulations de la tyrosine hydroxylase du

mouton par hybridation *in situ* sur des coupes d'encéphale prélevées au cours des différentes phases du cycle sexuel du mouton et sur le plan quantitatif en « Northern blot ». Ce travail sera développé dans le cadre d'un réseau avec l'INRA de Tours.

2. Structure et localisation chromosomique de la DOPA décarboxylase (AADC) et de l'histidine décarboxylase (HDC)

La DOPA décarboxylase (AADC) et l'histidine décarboxylase (HDC) couvrent à elles deux, trois importants réseaux de neuromédiateurs, qui interviennent dans les systèmes nerveux central et périphérique : les voies catécholaminergiques, sérotoninergiques et histaminergiques. Ces deux enzymes sont probablement dérivées d'un gène ancestral commun comme le suggère les similitudes de séquence de leur ADNc et les analogies du mode de fonctionnement : elles utilisent toutes deux le phosphate de pyridoxal comme cofacteur dont le site de fixation est identique sur la séquence polypeptidique.

Ces deux enzymes ont cependant des rôles distincts : l'histidine décarboxylase est l'unique enzyme responsable de la synthèse de l'histamine tandis que l'AADC est placée en aval de la tyrosine hydroxylase et de la tryptophane hydroxylase, qui en tant qu'enzymes clés de la voie de biosynthèse des neuromédiateurs, sont le siège des mécanismes de régulation.

Pour mieux comprendre le fonctionnement de ces marqueurs neuronaux, nous avons cloné les gènes de l'AADC et de l'HDC et nous avons analysé la structure des régions de chacun des gènes qui correspondent aux séquences promotrices.

Dans le gène DDC du rat, deux régions ont été identifiées : la région précédant l'exon I et l'exon II. Leurs séquences ont été déterminées, elles sont caractéristiques de protéines spécifiques possédant des boîtes TATA proches des séquences consensus. La séquence en amont de l'exon I est le promoteur des tissus non neuronaux, celle en amont de l'exon II est celui des tissus nerveux.

Le clonage de ces gènes et la connaissance de leur séquence ont permis d'obtenir les outils nécessaires à l'exploration des génomes murins et humains. Le gène AADC a été localisé sur le chromosome 14 du rat et les chromosomes 11 de la souris et de l'homme. Il est toujours situé près du locus du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF). La localisation sur le chromosome 11 de l'homme et de la souris nous a permis de pousser un peu plus loin notre analyse en collaboration avec H. Jockusch. Nous avons ainsi réussi à déterminer précisément le site de la mutation « Wobbler » responsable d'une atrophie musculaire spinale de la souris. Ce site est encadré entre le gène AADC et le gène Spnbr d'une isoforme de la spectrine.

Le gène de la HDC est positionné sur le chromosome 2 de la souris, nous en réalisons actuellement la localisation précise avec M.G. Mattei. La fonctionnalité des deux promoteurs de l'AADC est en cours d'étude, le problème consiste à déterminer quels sont les mécanismes qui permettent à chacun d'eux de fonctionner indépendamment dans des cellules d'origine embryonnaire différente.

3. *Etude de l'AADC au cours de l'embryogénèse*

Une approche de l'expression de l'AADC a été entreprise au cours du développement embryonnaire du rat. Tout d'abord, grâce aux anticorps anti AADC préparés au laboratoire, nous avons repéré sur coupe d'embryon de rat la répartition des cellules contenant de l'AADC. En nous aidant des résultats réalisés par d'autres chercheurs, nous avons pu caractériser des régions du système nerveux et des organes de la périphérie qui expriment l'AADC avant la naissance et qui ne l'expriment plus à l'âge adulte, laissant postuler l'existence d'un rôle de cette enzyme au cours du développement. Les fragments 5' non codants fournissent des sondes qui par hybridation in situ permettent de déterminer la nature des ARN synthétisés.

4. *Etude de l'expression de l'AADC chez les eukaryotes*

La nécessité d'étudier le rôle et l'incidence de la présence de l'AADC dans les cellules en cas de greffe, nous a poussé à infecter des précurseurs de cellules gliales par des pseudo virus recombinants. Avec P. Horellou, nous avons inséré l'ADNc entre les LTR du virus de la leucémie de la souris. Les précurseurs des cellules gliales et neuronales isolés de cerveau de rat nouveau-né peuvent être infectés et exprimer l'AADC après que l'ADN se soit inséré dans l'ADN génomique. Les cellules produisent l'enzyme en abondance et meurent probablement sous l'effet d'une production excessive d'amines anormales comme la tyramine, la phényléthylamine et la tryptamine. La supplémentation du milieu par la DOPA ou le 5-hydroxytryptophane (les précurseurs normalement présent dans les neurones catécholaminergiques et sérotoninergiques) devrait nous permettre d'étudier cette cytotoxicité des produits de décarboxylation.

5. *Etude de la protéine AADC*

La partie codante de l'ADNc de l'AADC a été insérée dans un vecteur d'expression permettant de produire une protéine de fusion. Placée en aval de la β -galactosidase, l'AADC s'est révélée être un puissant antigène. La reproductibilité du système de production de la protéine et la qualité de l'antisérum ont permis d'envisager une demande de brevet et un projet de commercialisation avec la FIST.

En utilisant un second vecteur d'expression, le plasmide pMal de *E. coli*, nous avons réussi à produire une protéine de fusion Maltose binding protein-AADC (MBP-AADC) qui possède une activité décarboxylase. Nous déterminons actuellement les conditions optimales de production et de purification de cette protéine recombinante. Une protéase spécifique, le facteur Xa permet de séparer MBP et AADC. Cet isolement de l'AADC active, produite chez *E. coli* nous apporte des réponses intéressantes concernant sa fonction enzymatique qui ne requiert donc pas ou peu de modifications post-traductionnelles. Si dans les cellules animales de telles modifications existent, elles jouent vraisemblablement un rôle modulateur de la fonction catalytique. La production de cette protéine active ouvre la voie à des études moléculaires physico-chimiques pour déterminer le site catalytique de l'AADC.

6. Clonage des glutamate décarboxylases 1 et 2

Deux enzymes la GAD1 de masse moléculaire 67 000 et la GAD2 de 65 000 assurent la décarboxylation de l'acide glutamique en acide gamma-amino-butyrique (GABA) un neuromédiateur connu pour ses effets inhibiteurs. Par PCR à partir des ARN messagers isolés du cerveau de rat, nous avons réussi à cloner les ADNc des deux formes : les ADNc ont été insérés dans le cadre de lecture du vecteur d'expression pMal.

Les protéines de fusion obtenues ont été séparées de la protéine à haute affinité pour le maltose (MBP) grâce à l'utilisation d'une protéase spécifique : le facteur Xa. Les GAD ainsi produites ont été injectées au lapin et l'antisérum anti GAD 67 est d'ores et déjà utilisé pour reconnaître sans ambiguïté son antigène soit sur des membranes de « Western Blot », soit sur des coupes de tissus.

Les ADNc de ces deux GAD ont été marqués au ^{32}P et ont fourni des sondes nucléiques qui ont été utilisées pour la localisation de chacune des formes sur les chromosomes du rat : le chromosome 3 pour la GAD 1 et le 17 pour la GAD 2.

7. Recherches immunocytologies

La plupart des antisérums que nous avons préparés au laboratoire, nous ont permis de développer des collaborations avec des chercheurs intéressés par la caractérisation des voies dopaminergiques ou sérotoninergiques par immunocytologie. Nous signalerons particulièrement les résultats que nous avons obtenus sur le développement du rat, avec l'équipe du D^r Ugrumov à Moscou, en utilisant les sérums anti TH et anti AADC. Ceux de Y. Tillet à Tours, qui avec les mêmes sérums, a pu cartographier des zones du cerveau de mouton. En collaboration avec l'équipe de A. Calas et M.F. Franzoni, nous avons pu définir avec précision le domaine de l'utilisation d'un sérum anti AADC réalisé à partir d'une protéine de fusion produite par *E. coli*. Cet antisérum

cross — réagit avec toutes les classes de vertébrés et donne de plus des informations intéressantes sur la structure de cette protéine très conservée en séquence d'acides aminés, chez les mammifères, mais dont la masse moléculaire subit des variations de taille significatives d'une espèce à l'autre.

Identification et étude de gènes régulateurs contrôlant la prolifération et la différenciation des cellules nerveuses et précurseurs. Immortalisation et transformation cellulaire.

(P. ROUGET, R. BERNARD, I. BORDE, A. DO THI, E. DUPONT, C. EVRARD, E. GALIANA, I. SANSAL)

Tout d'abord, nous avons initié et mis au point de nouvelles méthodologies basées sur le transfert d'oncogènes définis, permettant l'immortalisation des différentes catégories de cellules nerveuses. Nous avons ainsi établi des lignées permanentes correspondant à diverses sous-populations de cellules nerveuses et précurseurs. Nous avons également montré que l'utilisation de souris transgéniques portant les séquences grand T du virus polyome est une autre approche permettant l'immortalisation de cellules nerveuses. À l'aide de ces lignées cellulaires immortalisées, nous étudions les mécanismes moléculaires intervenant dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation.

Dans le cadre de cette étude, nous avons mis l'accent sur la recherche de nouveaux gènes codant pour des facteurs, impliquant des motifs hélice-boucle-hélice, qui interviennent dans le contrôle de la division et de la différenciation. Nous avons ainsi identifié le gène régulateur NPDC-1, cloné et séquencé le cDNA correspondant. Ce gène code pour une protéine comportant deux domaines de type « Hélice-Loop-Hélice » et plusieurs sites consensus pour les MAP-kinases. Le gène NPDC est exprimé sélectivement dans les cellules nerveuses et la protéine intervient dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation.

La transfection de vecteurs eucaryotes dans diverses lignées de cellules nerveuses a montré que l'expression de NPDC-1 provoque l'arrêt des divisions cellulaires et le déclenchement de la différenciation. De plus, le transfert stable de vecteurs d'expression pour NPDC-1, dans des lignées transformées de différentes origines, conduit à une régulation négative de la prolifération ainsi qu'à une suppression de la transformation. Nous entreprenons d'identifier les protéines avec lesquelles NPDC est capable d'interagir et d'étudier le rôle de NPDC au cours du cycle cellulaire.

La construction de vecteurs procaryotes, d'abord du type T3 et T7, ont permis de produire la protéine après transcription-traduction *in vitro* et d'observer sa capacité à former des homodimères. Nous avons ensuite cons-

truit des vecteurs procaryotes conduisant à l'obtention de protéines de fusion entre NPDC (complet ou tronqué) et la glutathion-S-transférase et permettant de produire la protéine de manière préparative. A l'aide de la protéine purifiée, nous avons obtenu des anticorps polyclonaux. La préparation de monoclonaux, dirigés contre différents domaines de NPDC, est en cours. Les anticorps polyclonaux déjà obtenus ont permis de montrer que la protéine synthétisée à faible niveau au cours de la croissance cellulaire reste dans le cytoplasme, alors qu'après confluence, elle devient localisée au noyau.

Nous avons commencé l'étude de l'expression de NPDC au cours du développement d'une part du tube neural et du SNC, d'autre part des structures nerveuses issues des crêtes et placodes. Divers vecteurs eucaryotes « inductibles », sens et anti-sens, sont en cours de construction. Afin d'examiner plus précisément le mode d'action de NPDC au cours de la différenciation et du développement, ils seront transférés d'une part dans des lignées cellulaires immortalisées, d'autre part dans la lignée germinale de la souris.

Parmi les autres travaux en cours concernant NPDC, citons : l'analyse du rôle des différentes hélices et des régions phosphorylables par mutagenèse dirigée ; le clonage et l'analyse des séquences génomique, leur localisation chromosomique. La caractérisation de la région promotrice est en cours. Nous envisageons ensuite d'étudier *in vivo* la fonction de NPDC, par recombinaison homologue (« knock-out » du gène associé à un marquage lacZ ; mutagenèse dirigée et substitution de séquences).

Une autre perspective est la mise au point d'un modèle animal de thérapie génique, à l'aide des séquences NPDC, soit portées par des vecteurs viraux recombinants, soit associées à des constructions permettant un ciblage de l'intégration par recombinaison homologue. En effet, dans une perspective de thérapie génique, le ciblage de l'intégration est particulièrement important, car il permet d'intégrer les gènes transférés en un site précis du génome.

Différenciation dans le tronc cérébral

(F. DE VITRY, J. CATELON)

Les conditions assurant la survie d'une population très limitée de cellules myogéniques issues du tronc cérébral de rat embryonnaire et néonatal ont été mises au point. Les cellules précurseurs sont capables de se différencier en fibres striées spontanément contractiles. L'analyse immunocytochimique a révélé l'expression de deux protéines musculaires, desmine, troponine T aussi bien dans les précurseurs mononucléés que dans les myotubes différenciés. *In vivo* l'observation des coupes à des stades de développement correspondants confirme la localisation simultanée de desmine, troponine T et de sites de liaison de la lectine *Griffonia simplicifolia*, un marqueur de cellules endothéliales. Il est frappant de constater la proximité des plexus choroïdes — neuroépithélium et mésenchyme — et celle des cellules troponine T+ des-

mine +. Ces résultats suggèrent une interrelation étroite entre les cellules musculaires que nous décrivons et la naissance de la circulation cérébrale et soulèvent la question de l'origine embryologique des cellules myogéniques cérébrales.

PUBLICATIONS

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, 615-626, 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., 32, 123-132, 1993).*

N.A. BORISOVA, M.V. UGRUMOV, I.S. BALAN, J. THIBAUT. *Development of the tubero infundibular system in rats : birthdates of the tyrosine hydroxylase-immunopositive neurons (Dev. Brain Res., 73, 173-176, 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, 5, 1287-1291, 1993).*

D. DE RICQLES, A. OLOMUCKI, F. GOSSELIN, R. LIDEREAU. *Breast cancer and T-cell-mediated immunity to proteins of the mouse mammary tumor virus (MMTV) (Eur. Cytokine Netw., 4, 153-160, 1993).*

K. DJABALI, A. ZISSOPOULOU, M.J. DE HOOP, S.D. GEORGATOS, C.G. DOTI. *Peripherin expression in hippocampal neurons induced by muscle soluble factor(s) (J. Cell Biol., 123, 1197-1206, 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., 159, 75-86, 1993).*

A. ESPINOZA DE LOS MONTEROS, R. BERNARD, B. TILLER, P. ROUGET, J. DE VELLIS. *Grafting of fast blue labeled glial cells into neonatal rat brain : differential survival and migration among cell types (Int. J. Dev. Neurosci., 11, 625-640, 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., 36, 133-146, 1993).*

F. GOSSELIN, M. GERVAISE, A. JOFFRE, M.M. PORTIER. *La reconstitution in vitro de gencive humaine : un nouveau modèle expérimental pour les parodontologistes (J. Parodontol., 12, 213-223, 1993).*

F.C. ITURRIZA, J. THIBAUT. *Immunohistochemical investigation of tyrosine-hydroxylase in the islets of Langerhans of adult mice, rats and guinea pigs (Neuroendocrinology, 57, 476-480, 1993).*

M. OLOMUCKI. *Les théories de la vie. (Ça m'intéresse, 148, 28-29, 1993, interview de P. Marchetti).*

M.M. PORTIER, M. ESCURAT, F. LANDON, K. DJABALI, O. BOUSQUET. *Peripherin and neurofilaments : expression and role during neural development (C. R. Acad. Sci., Paris, Life Sciences, 316, 1133-1140, 1993).*

M.M. PORTIER, F. LANDON. *Peripherin. Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins (Eds Kreis & Vale ; Oxford University Press, 165-166, 1993).*

A. SALVETTI, A. LILIENBAUM, M.M. PORTIER, P. GOUNON, D. PAULIN, L. GAZZOLO. *Organization and expression of intermediate filaments in epithelial cells expressing the HTLV-I Tax protein (Eur. J. Cell Biol., 61, 383-391, 1993).*

S. SAULE, M. FAUQUET. *Avian retroviruses : tools for generating immortalized neural cells and studying neural differentiation. Neuroprotocols : a companion to methods in (Neurosciences, 3, 232-242, 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., 20, 125-129, 1993).*

1994

A. ANSELMET, M. FAUQUET, J.M. CHATEL, Y. MAULET, J. MASSOULIÉ, F.M. VALLETTE. *Evolution of acetylcholinesterase transcripts and molecular forms during development in the central nervous system of the quail (J. Neurochem., 62, 10158-10165, 1994).*

S. AUDEBERT, A. KOULAKOFF, F. GROS, P. DENOULET, B. EDDÉ. *Developmental regulation of polyglutamylated α - and β -tubulin in mouse brain neurons (J. Cell Sci., sous presse, 1994).*

M. BELTRAMO, M. KRIEGER, Y. TILLET, J. THIBAUT, A. CALAS, V. MAZZI, M.F. FRANZONI. *Immunolocalization of aromatic L-aminoacid decarboxylase in goldfish (Carassius auratus) brain. A comparison with tyrosine hydroxylase and serotonin immunoreactivities (J. of comparative Neurology, sous presse, 1994).*

R. BERNARD, M. LE BERT, I. BORDE, E. GALIANA, C. EVRARD, P. ROUGET. *Immortalization of different precursors of glial cells with a targeted and temperature sensitive oncogene (Exp. Cell Res., sous presse, 1994).*

D. BOUCHER, J.C. LARCHER, F. GROS, P. DENOULET. *Polyglutamylation of tubulin : a progressive regulator of the interaction between the microtubule-associated protein Tau and tubulin (en révision à Biochemistry, 1994).*

M.H. BRÉ, B. DE NÉCHAUD, A. WOLFF, A. FLEURY. *Glutamylated tubulin probed in ciliates with the monoclonal antibody GT 335 (Cell Motil. Cytosk., 27, 337-349, 1994).*

S. CHADAN, K.L. MOYA, M.M. PORTIER, G. FILLIATREAU. *Identification of a peripherin dimer : changes during axonal development and regeneration of the rat sciatic nerve (J. Neurochem., 62, 1894-1905, 1994).*

F. DE VITRY, J. HILLION, J. CATELON, F. GROS. *Myogenic cells in the rat embryonic brain stem (Compt. Rend. Acad. Sci., 317, 332-340, 1994).*

N. DEMIRKAPI, M. BASSEVILLE, M.C. LAGRANGE, S. BRAUN, F. GROS, B. CROIZAT. *Variations de l'expression de certaines protéines de la moelle épinière et du muscle dans l'amyotrophie spinale infantile (Rev Neurol., 150 (3), 196-200, 1994).*

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., 27, 49-58, 1994).*

E. GALIANA, P. VERNIER, E. DUPONT, C. EVRARD, P. ROUGET. *Identification of a neural-specific cDNA, NPDC-1, which is able to regulate negatively cell proliferation and to suppress oncogenic transformation (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, sous presse, 1994).*

D. GROUSSELLE, J. ROLAND, A. ROUSSELET, P. DENOULET, P.A. CAZENAVE, A. TIXIER-VIDAL, D. GOURDJI. *Production and characterization of polyclonal antiidiotypic anti-thyrotropin-releasing hormone (TRH) antibodies : application to the study of pituitary TRH receptor. Neuroendocrinol (sous presse, 1994).*

J. HILLION, J. CATELON, M. RIAD, M. HAMON, F. DE VITRY. *Neuronal localization of 5-HT_{1A} receptor mRNA and protein in rat embryonic brain stem cultures (Dev. Brain. Res., 79 (2), 225-232, 1994).*

A. KELLER, A. BÉROD, M. DUSSAILLANT, N. LAMANDÉ, F. GROS, M. LUCAS. *Coexpression of α and γ enolase genes in neurons of adult rat brain.* (*J. Neurosci. Res.*, sous presse, 1994).

A. LENGELING, W.E. ZIMMER, S.R. GOODMAN, Y. MA, M.L. BLOOM, G. BRUNEAU, M. KRIEGER, J. THIBAUT, K. KAUPMANN, H. JOCKUSCH. *Exclusion of two candidate genes, Spnb-2 and DDC, for the wobbler spinal muscular atrophy gene on proximal mouse chromosome 11.* (*Mammalian. Genome*, 5, 163-166, 1994).

M. NECHAD, E. RUKA, J. THIBAUT. *Production of nerve growth factor by brown fat in culture : relation with the in vivo developmental stage of the tissue* (*Comp. Biochem. Physiol.*, 107 A, 381-388, 1994).

J. NGUYEN-LEGROS, M. KRIEGER, A. SIMON. *Immunohistochemical localization of L-DOPA and aromatic L-amino acid-decarboxylase in the rat retina* (*Invest. Ophthalmol. and Visual Sci.*, sous-presse, 1994).

F. RHRICH-HADDOUT, J.C. HORVAT, C. BAILLET-DERBIN, K. DJABALI, M.M. PORTIER. *Expression of peripherin in solid transplants of foetal spinal cord and dorsal root ganglia grafted to the injured cervical spinal cord of adult rats* (*Neurosci. Lett.*, 170, 59-62, 1994).

Y. TILLET, J. THIBAUT, M. KRIEGER. *Aromatic L amino acid decarboxylase. Immunohistochemistry in the suprachiasmatic nucleus of the sheep. Comparison with Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry* (*Brain Research.*, sous presse, 1994).

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*, 58, 151-160, 1994).

A. WOLFF, M. HOUDAYER, D. CHILLET, B. DE NÉCHAUD, P. DENOULET. *Structure of the polyglutamyl chain of tubulin : Occurrence of α - and γ -linkages between glutamyl units revealed by monoreactive polyclonal antibodies* (*Biol. Cell*, 81, sous presse, 1994).

THÈSE DE DOCTORAT

G. DOS SANTOS, « *Etude d'une nouvelle forme de canal sodique voltage-dépendant : Structure primaire et spécificité tissulaire et cellulaire* », mars 1994 (Université Pierre et Marie Curie).

C. VASSORT, « *Etude de quatre enzymes de biosynthèses de neurotransmetteurs : la tyrosine hydroxylase, la choline acétyltransférase et les glutamate décarboxylases 1 et 2* », septembre 1993 (Université Paris XII).

R. BERNARD, « *Transfert de gènes dans des précurseurs gliaux. Immortalisation cellulaire, Prolifération et Différenciation des lignées établies* », avril 1994 (Université Paris XI).

I. BORDE, « *Tranfert de gènes et immortalisation de précurseurs de cellules nerveuses murines. Etude de la prolifération et de la différenciation des lignées immortalisées* », juin 1994 (Université Paris VII).

CONFÉRENCES, INVITATIONS, PARTICIPATION À DES CONGRES

Le Professeur François GROS a été invité à prononcer l'une des conférences générales au All India Institute de New Delhi, à l'occasion du 20^e anniversaire de l'Indian National Academy of Sciences, conférence intitulée « *Regulatory mechanisms and somatic cell differentiation* ». La conférence de clôture du Congrès Européen de Biotechnologie qui s'est tenu à Florence (juillet 1993), conférence intitulée « *Achievements and future prospects in Biotechnology* » a été publiée dans les Annales de l'Institut Pasteur. Plus récemment, il a été demandé au Professeur GROS de donner une conférence quelque peu similaire à l'inauguration du nouveau bâtiment de Biotechnologie de l'Université de Tel Aviv (juin 1994).

Le Professeur François GROS a également été invité à présenter ses travaux sur la myogenèse et sa régulation lors du Colloque international organisé par le Professeur N. Le Douarin, à l'occasion du lancement de la nouvelle série III des Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Il en a été de même à l'Université de Bordeaux où s'est tenue une importante réunion internationale dans le cadre des accords Institut Weizmann, Université de Bordeaux, réunion dont le thème central était « *le message* » et où le Professeur François GROS a présenté une mise au point générale : « *Le message en Biologie* » qui a été publiée dans « *La vie des Sciences* ».

M^{me} Y. BERWALD-NETTER a donné une conférence : *Isoformes cérébrales des canaux Na voltage-dépendants : spécificité cellulaire, relation structure-fonction, développement et modulation* ; 4^e Colloque « *Canaux Ioniques* » (Carry le Rouet ; octobre 1993).

Elle a également donné une conférence : *Na-G novel isoform of voltage-gated Na channel ; Workshop « Transmitter Receptors and Ion Channels in Glial Cells »* (Dresde, Allemagne ; mai 1994).

M. B. CROIZAT a donné une conférence : *Variations de l'expression de certaines protéines de la moelle épinière et du muscle dans l'amyotrophie spinale infantile* au V^e Congrès de la Société Européenne de Neurologie Pédiatrique (Strasbourg ; novembre 1993).

M. S. AUDEBERT a donné un séminaire : *Analyse biochimique et cellulaire de la polyglutamylation de la tubuline* ; Rencontres Doctorales de Biochimie - Biologie, (Paris ; mars 1994).

M. Ph. DENOULET a été invité à donner 7 conférences : 1) *Polymorphisme fonctionnel des protéines microtubulaires. Rôle des modifications post-traductionnelles de la tubuline dans le contrôle des interactions entre microtubules et protéines associées* ; INSERM U 152, Institut Cochin de Génétique Moléculaire (Paris ; janvier 1994) ; 2) *Rôle de la polyglutamylation de la tubuline dans la régulation des interactions entre microtubules et protéines associées* ; Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie Fondamentales [LPTF], CNRS, (Toulouse ; janvier 1994) ; 3) *Les moteurs moléculaires des microtubules* ; D.E.A. de Biochimie-Biologie Intégrative des Protéines (Université Paris VI ; mars 1994) ; 4) *Polymorphisme des protéines microtubulaires : rôle des modifications post-traductionnelles de la tubuline dans le contrôle des interactions avec les MAPs* ; Conférences associées au Cours du P^r F. Gros, Collège de France, Institut Pasteur (Paris ; mars 1994) ; 5) *Polymorphismes génétique et post-traductionnel des tubulines* ; cours de Biologie Moléculaire de la Cellule, Institut Pasteur (Paris ; avril 1994) ; 6) *Régulation des interactions entre microtubules et MAP's : implications des modifications post-traductionnelles de la tubuline* ; INSERM U 99, Hôpital Henri-Mondor (Créteil ; mai 1994) ; 7) *Tubulines et modifications post-traductionnelles* au XIV^e Réunion du Club Français du Cytosquelette (Banyuls ; juin 1994).

M. B. EDDÉ a été invité à donner deux conférences : 1) *La polyglutamylation de la tubuline : une nouvelle modification post-traductionnelle* ; Laboratoire de Biochimie Cellulaire, Centre d'Etudes Nucléaires (Grenoble ; mai 1994) ; 2) *La diversité des isotubulines au niveau génétique et post-traductionnel*. (Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, Rhône-Poulenc Rorer ; février 1994).

M^{me} A. KELLER et M. LUCAS ont été invitées à présenter une conférence : *Les isozymes de l'énolase, marqueurs des tissus nerveux et musculaires. Données sur le cœur en développement et au cours de l'hypertrophie à l'unité* INSERM 127 Hôpital Lariboisière (Paris ; mars 1994).

M^{me} A. KELLER a été invitée à présenter une conférence : *Les isoenzymes de l'énolase, marqueurs des tissus nerveux et musculaires chez les vertébrés supérieurs : régulation de leur expression au cours du développement et chez l'adulte* à l'Université Paris XI-Centre d'Orsay (Paris ; avril 1994).

Elle a également présenté deux communications affichées : 1) *Coexpression of α and γ enolase genes in neurons of adult rat brain* à la 18^e conférence en neurobiologie de Gif-sur-Yvette (Décembre 1993) ; 2) *Regulation of tissue specific expression of enolase isoforms* au 4^e Congrès Européen de Biologie Cellulaire, Prague, (République tchèque ; juin 1994).

M^{me} M. LAZAR a présenté deux communications orales : 1) *Transcriptional regulation of the mouse gene encoding the muscle-specific isoform of the glycolytic enzyme enolase (β -enolase)* au XXII European Muscle Congress, Suisse (Gwatt ; octobre 1993) ; 2) *Regulation of the mouse gene encoding muscle-specific enolase*. Molecular Biology at the Border of the XXI Century, Genome Structure and Functional Analysis (Moscou ; juin 1994).

Elle a également donné un séminaire : *Régulation de l'expression des gènes codant les isozymes de l'énolase, marqueurs du développement des tissus nerveux et musculaire*. Chaire de Neuropharmacologie, Collège de France, (Paris ; mars 1994).

M^{me} LUCAS a présenté une communication affichée : *Differential expression of α and β enolase gene products in rat heart during development and hypertrophy* au International Workshop Cardiac Growth and Regeneration à Viterbo (Italie ; juin 1994).

M. O. BOUSQUET a été invité à donner un séminaire : *Une protéine de filament intermédiaire neuronale : la périphérine*. ICGM, U 129 : Génétique et Pathologie Moléculaires, CHU Cochin-Port Royal (Paris ; octobre 1993).

Il a également été invité à présenter deux communications : 1) *De novo formation of the peripherin network in different cell lines* au 8th Annual Meeting of the European Cytoskeletal Forum (Assise, Italie ; septembre 1993) ; 2) *Structure du cytosquelette des fibroblastes de cas de neuropathies à axones géants* au Colloque « Biologie du Nerf Périphérique et Neuropathies Génétiques de l'Enfant » à l'Institut de Neurosciences, Université Paris VI (mars 94).

M^{me} M.M. PORTIER a présenté trois séminaires : 1) *Les protéines de filaments intermédiaires et leurs associations* à l'Institut Cochin de Génétique Moléculaire (Paris ; février 1994) ; 2) *La périphérine, protéine de structure neuronale : Régulation de son expression* à l'unité INSERM 153 : « Développement, pathologie, régénération du système neuro-musculaire » (Paris ; avril 1994) ; 3) *La périphérine, protéine du cytosquelette neuronal : régulation d'une expression modulable*. Groupe de laboratoires de l'I.R.S.C. (Villejuif ; mai 1994).

Elle a été invitée à deux colloques : 1) Réunion : « Biologie du nerf périphérique et neuropathies génétiques de l'enfant » où elle a présenté un exposé : *Protéines du cytosquelette axonal*, à l'Institut de Neurosciences, Université Paris VI (mars 94) ; 2) « Club Français du Cytosquelette » où elle a

présenté un exposé : *Généralités sur les filaments intermédiaires* (Banyuls ; juin 1994).

Elle a également participé à l'enseignement du : 1) DESS *Modèles cellulaires in vitro*, deux heures de cours sur Les Filaments Intermédiaires (Université de Créteil ; décembre 1993) ; 2) *Cours International Théorique et Pratique sur l'analyse biochimique, immunologique et fonctionnelle des antigènes de surface des lymphocytes* (mars 1994) ; 3) Cours Pasteur *Biologie moléculaire de la cellule*, deux heures sur Les Filaments Intermédiaires (Paris ; avril 1994).

M^{me} A. WOLFF a présenté une communication : *Monoclonal antibodies probing for the glutamylatable sequence of tubulin au 8th Annual Meeting of the European Cytoskeletal Forum* (Assise, Italie ; septembre 1993).

M^{lle} F. JEBAI a présenté une communication affichée : « Synthèse de la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) active chez *E. coli* » au Congrès d'automne de la Société Française de Biochimie et Biologie moléculaire (SFBBM) (Paris ; décembre 1993).

M^{me} M. KRIEGER a été invitée à donner deux séminaires : 1) *Le rôle de la DDC se limite-t-il au système nerveux central ?* Club des Neurosciences de Créteil (novembre 1993) ; 2) *Les différentes fonctions de la DOPA décarboxylase*. UMR 9921, M. B. PAU (Montpellier ; octobre 1993).

M^{me} F. DE VITRY a participé au Colloque de la Société Française de Biologie et Génétique : *Gènes et développements homéotiques*, (Institut Pasteur, Paris ; septembre 1993) ; ainsi qu'à la réunion de la Fondation IPSEN « Hormones hypophysaires, système neuro végétatif et immunité » (Paris ; juin 1994).

M^{me} C. EVRARD a été invitée à donner une conférence : *Expression of a reporter gene and of an oncogene during neural development, in transgenic mice*, au 14th Meeting of the International Society for Neurochemistry (1993).

M. P. ROUGET a été invité à donner une conférence : *Identification of a gene involved in the control of neural cell proliferation and differentiation*, au 14th Meeting of the International Society for Neurochemistry (1993).

GRUPE DE BIOLOGIE DE LA CELLULE NEUROENDOCRINE
URA CNRS 1115

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

ACTIVITÉS SCIENTIFIQUES

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

L'objectif général de nos recherches réside dans l'analyse fine des différentes étapes du processus sécrétoire dans un modèle particulier de cellule neuroendocrine : la cellule antéhypophysaire à prolactine. Au cours de l'année écoulée, ces recherches sont restées centrées, d'une part, sur l'étude du transport intracellulaire de cette hormone, la prolactine, et d'autres produits de sécrétion spécifiques des neurones et des cellules neuroendocrines, les granines, et d'autre part sur l'analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du trafic membranaire associé au processus sécrétoire. Ces études ont été principalement réalisées sur deux modèles de cellules à prolactine en culture : les cellules à prolactine dans des cultures primaires de cellules anté-hypophysaires de rat et des cellules à prolactine de rat en lignée continue, les cellules GH3B6. En outre, à certains stades de nos recherches, nous avons étendu nos investigations à d'autres modèles de cellules neuroendocrines, comme les cellules chromaffines, ou à d'autres modèles de cellules sécrétrices.

Parmi les différents thèmes de recherche abordés cette année au sein de notre groupe et/ou en collaboration avec d'autres laboratoires de l'Institut de Biologie du Collège de France ou extérieurs, certains ont été particulièrement développés :

1. *Mise en évidence de l'hétérogénéité du contenu des grains de sécrétion dans les cellules à prolactine*

Avant de libérer leurs produits de sécrétion vers le milieu extracellulaire, lors de la stimulation par des agents sécrétagogues, les cellules neuroendocrines présentent la caractéristique de les stocker dans un compartiment spécialisé, les grains de sécrétion. Par conséquent, le nombre des grains de sécrétion varie en fonction de l'activité fonctionnelle des cellules. Il a été précédemment montré que, outre le produit de sécrétion spécifique de ces cellules, la matrice des grains de sécrétion des neurones neurosécréteurs et des cellules neuroendocrines contient également d'autres protéines et en particulier

des protéines acides sulfatées sur les tyrosines, les granines. Nous avons ainsi pu détecter des protéines de la famille des granines, les sécrétogranines I et II, dans les grains de sécrétion des cellules à prolactine. Nous avons alors recherché par des expériences d'immunocytochimie ultrastructurale, avec des doubles ou des triples marquages à l'or colloïdal, la distribution subcellulaire de la prolactine et des sécrétogranines dans les cellules à prolactine placées dans différentes conditions expérimentales *in vivo* ou *in vitro*. On sait en effet que, en fonction de l'environnement hormonal, l'expression des gènes de la prolactine et des sécrétogranines peut être régulée de manière différentielle (LAVERRIÈRE et al., 1991). Nous avons ainsi pu montrer que la teneur respective des grains de sécrétion en prolactine et en sécrétogranines pouvait varier. De plus, nous avons mis en évidence une hétérogénéité dans la distribution de ces protéines au sein de la matrice granulaire. Ces observations suggèrent d'une part que la sécrétogranine I pourrait interagir avec la membrane du granule et d'autre part, que différents types d'agrégation moléculaire, homotypiques ou hétérotypiques, pourraient intervenir au cours de la formation des grains de sécrétion (OZAWA et al., 1994).

2. Recherche de protéines G intracellulaires susceptibles de jouer un rôle dans le trafic membranaire associé au processus sécrétoire

Dans le cadre de nos recherches sur la régulation du transport intracellulaire mis en jeu dans le processus sécrétoire, nous avons récemment abordé un nouvel axe de travail, 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 intracellulaires, protéines qui seraient susceptibles de jouer un rôle dans la régulation de ce transport.

Nous avons ainsi obtenu, en collaboration avec Vincent HOMBURGER, dans le laboratoire de Joël BOCKAERT à Montpellier, des résultats tout à fait originaux sur la localisation subcellulaire de plusieurs sous-unités de protéines G hétérotrimériques, non seulement au niveau de la membrane plasmique des cellules hypophysaires, mais également au niveau de la membrane des grains de sécrétion. La teneur respective de chacune de ces sous-unités semble varier. Ces résultats ont fait l'objet d'un manuscrit (MULLER et al., sous presse). Nous recherchons actuellement le rôle fonctionnel éventuel de ces protéines G hétérotrimériques dans le transport intracellulaire de la prolactine entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique.

La recherche de la distribution subcellulaire de petites protéines G à l'intérieur des cellules à prolactine a également été entreprise : rab 3 A et B (en collaboration avec François DARCHEN dans le laboratoire de J.P. HENRY et avec Ahmed ZAHRAOUI, Paris) et rab 6 (en collaboration avec Bruno GOUD, Paris).

3. *Etude de la signification fonctionnelle de l'hétérogénéité morphologique des cellules à prolactine*

Les cellules à prolactine de rat présentent une hétérogénéité morphologique associée à une hétérogénéité fonctionnelle. La relation qui existe entre ces deux types d'hétérogénéité n'a pas pour l'instant été clairement établie. Dans notre laboratoire, E. VILA-PORCILE a précédemment adapté, pour la microscopie électronique, une technique particulière, le « reverse hemolytic plaque assay » (RHPA), qui permet d'analyser et de quantifier la libération hormonale à l'échelle d'une seule cellule (cf. rapport d'activité 1992-1993) (VILA-PORCILE et al., 1994). Pour progresser dans l'analyse de la relation « structure-fonction » des cellules à prolactine, E. VILA-PORCILE a poursuivi ses recherches par une approche conjointe de RHPA couplée à une étude ultrastructurale et immunocytochimique. Elle a récemment recueilli des informations montrant que les cellules à prolactine de la zone externe et celles de la zone interne de l'hypophyse de rat qui répondent d'une manière différentielle à des agents physiologiques stimulateurs ou inhibiteurs, correspondent à des sous-populations distinctes de cellules à prolactine, identifiées sur des critères ultrastructuraux.

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

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

Les résultats que nous présentons ci-dessous concernent deux facettes potentiellement interactives de la régulation neuroendocrine du gène de la prolactine et de la sécrétion de cette hormone : l'étude de la transmission de l'information de la membrane au noyau *via* l'induction de proto-oncogènes nucléaires précoces de la famille *fos/jun* et la recherche des mécanismes par lesquels la méthylation de l'ADN interfère avec la régulation transcriptionnelle du gène de la prolactine. Les expériences correspondantes ont été conduites presque exclusivement sur des lignées clonales de cellules antéhypophysaires de Rat (lignées GH) caractérisées au laboratoire. Outre ces travaux, en continuité directe des recherches amorcées l'an passé, d'autres thèmes ont été abordés en parallèle, thèmes relatifs à des propriétés des cellules GH probablement importantes quant à leur régulation neuroendocrine. Il s'agit d'une part, en collaboration avec J. EPELBAUM (INSERM U 159), de la caractérisation d'isoformes du récepteur de la somatostatine et d'autre part, de la recherche de l'expression du gène du pro-TRH dans ces lignées hypophysaires (D. GROUSSELLE, en collaboration avec le laboratoire de F. PEILLON, INSERM U 223). Enfin, nous nous sommes intéressés à l'interaction d'une benzamide avec les effets antiprolactiniques de la dopamine, dans le cadre

d'une coopération avec les laboratoires Synthélabo-Delagrangre et impliquant M^{lle} Véronique TAVERNIER.

1. Régulation de l'expression des proto-oncogènes *c-fos* et *jun B* dans la lignée GH3B6

Nous avons précédemment démontré que certains protooncogènes nucléaires codant pour les constituants majeurs du facteur transcriptionnel AP1 étaient activés de manière biphasique par le neuropeptide TRH dans les cellules GH3B6 (PASSEGUÉ et al., 1994). Notre premier objectif a donc été d'identifier les systèmes de seconds messagers impliqués dans cet effet du TRH.

Pour cela, nous nous sommes fondés sur des travaux antérieurs démontrant le couplage du récepteur du TRH au catabolisme des inositolphosphates, ainsi que du fait que l'augmentation conjointe du calcium cytosolique et de l'activité PKC rend compte des effets transcriptionnels du TRH sur le gène de la prolactine. Il ressort de l'analyse réalisée en Northern blot, que la stimulation par ce neuropeptide des mRNA *c-fos* et *jun B* est médiée en partie par une augmentation du calcium cytosolique. Cette étude révèle, en outre, que l'activation des deux proto-oncogènes par le TRH stimule aussi des mécanismes dépendant de l'adénylate cyclase, une observation compatible avec le couplage du récepteur du TRH à une protéine $G\alpha_{q/11}$. Enfin, il apparaît que l'expression des proto-oncogènes *c-fos* et *jun B* est soumise à une régulation en partie divergente, en réponse à la stimulation pharmacologique de certains systèmes de seconds messagers. Cette divergence est clairement mise en évidence après traitement à l'ester de phorbol TPA, seul ou en combinaison, réalisé sur des cellules naïves et sur des cellules désensibilisées par le TPA ou le neuropeptide. Ces dernières expériences indiquent de plus que le TRH ne recruterait probablement pas les mêmes isoformes de protéines kinases C pour activer *c-fos* et *jun B* (PASSEGUÉ et al., 1994, PASSEGUÉ et al., sous presse).

Le deuxième objectif de ce thème de recherche a concerné l'implication fonctionnelle de l'induction de *c-fos* et de *jun B* dans des cellules à prolactine. Ce problème a été abordé indirectement par la recherche de corrélations temporelles et pharmacologiques entre induction des oncogènes et induction de la libération de la prolactine ou du gène de la prolactine. Cette étude comparative a révélé qu'une stimulation de la libération aiguë de la prolactine accompagnait toujours le pic d'induction précoce des deux protooncogènes, en réponse à tous les activateurs de seconds messagers testés. Par contre, nos expériences révèlent que l'augmentation soutenue des mRNA *c-fos* et *jun B* n'est pas systématique et s'observe essentiellement en réponse aux facteurs capables d'induire aussi une stimulation du niveau des ARNm PRL. C'est le cas pour le BAY K 8644, la forskoline et, comme nous l'avons déjà montré, pour le TRH. Cette corrélation peut être mise en parallèle avec une observa-

tion préliminaire obtenue par retardement sur gel. Cette approche a ainsi montré qu'un domaine du promoteur de la prolactine (situé en position - 106/- 75 pb du site d'initiation de la transcription) est capable de déplacer de manière dose-dépendante la liaison d'une sonde canonique AP1 à des extraits nucléaires de cellules GH3B6 (PASSEGUÉ et al., soumis). Des études sont en cours, conduites par E. PASSEGUÉ, qui visent à préciser ces observations, en particulier par l'étude de l'induction des oncoprotéines *c-Fos* et *Jun B* dans ce modèle.

Enfin, le rôle déterminant des hormones à récepteur nucléaire dans le contrôle de l'expression du gène de la prolactine et du récepteur au TRH nous a amenés à aborder les effets de la dexaméthasone et de la T3 (S. OUKHERFELLA, DEA) et de l'estradiol 17 β (G. BOULLA). Les observations déjà obtenues montrent que ces hormones sont capables de réguler l'expression des proto-oncogènes *c-fos* et *jun B* et de moduler leur contrôle par le TRH.

2. Méthylation de l'ADN et expression du gène de la prolactine

L'objectif du travail réalisé par J.N. LAVERRIÈRE et V. NGO sur ce thème est de déterminer l'influence de l'état de méthylation de l'ADN sur l'activité des facteurs transcriptionnels intervenant dans la régulation de l'expression du gène de la prolactine. En effet, des résultats antérieurs avaient révélé l'existence d'une corrélation inverse entre l'état de méthylation du gène de la prolactine et son expression dans diverses lignées de cellules antéhypophysaires de rat (cf. LAVERRIÈRE et al., 1986 et rapport 1992-1993). Par ailleurs, comme nous l'avions indiqué, l'inhibition de l'expression du gène de la prolactine dans une lignée où ce gène est hyperméthylé (GH3CDL) n'est pas liée à un déficit en facteurs transcriptionnels tissulaires spécifiques tels que Pit-1. D'autre part, l'analyse comparative de l'expression de gènes recombinants pPRL-CAT natifs ou méthylés *in vitro* avait permis de conclure que la méthylation de l'ADN prévient l'activité du promoteur du gène de la prolactine, dans les conditions basales comme en réponse à des agents stimulants.

Deux types d'investigations ont donc été mis en œuvre en parallèle pour affiner ce résultat selon deux objectifs complémentaires. L'un de ces objectifs était de déterminer si la méthylation interfère avec la liaison ou avec les propriétés transactivatrices des facteurs transcriptionnels ciblant le gène de la prolactine. Le principe méthodologique a été de réaliser des expériences de compétition permettant de titrer la capacité de liaison du promoteur en fonction de l'état de méthylation.

Pour cela, J.N. LAVERRIÈRE et V. NGO ont construit des vecteurs contenant le promoteur proximal (p460 PRL) ou la totalité du promoteur du gène de la prolactine p2kb PRL, associé à une séquence codant pour le gène reporter CAT, rendue inactive par le décalage du cadre de lecture. La co-

transfection de tels vecteurs « muets » dans des cellules GH inhibe, de manière dose-dépendante, l'expression du gène CAT exprimée par un vecteur sauvage pPRL-CAT. Cette inhibition n'est pas observée lorsque les vecteurs muets transfectés sont méthylés *in vitro*, que les cellules transfectées soient maintenues dans les conditions contrôles ou soumises à des agents stimulant puissamment le gène de la prolactine. Ceci démontre, sans ambiguïté, que la méthylation altère profondément la liaison des facteurs transactivateurs du promoteur du gène de la prolactine impliqués dans l'expression constitutive, comme dans l'expression régulée (NGO et al., 1993, NGO et al., soumis).

L'autre objectif est de définir le rôle spécifique de la méthylation du promoteur du gène de la prolactine (par opposition à la méthylation globale envisagée jusqu'ici). J.N. LAVERRIÈRE et V. NGO se sont attachés à obtenir par clonage un vecteur tel que le promoteur de la prolactine puisse être excisé, méthylé *in vitro* et réinséré dans la bonne orientation. D'autre part, d'autres méthodes sont en cours de développement, qui devraient permettre de distinguer les sites du promoteur effectivement méthylés et les répercussions de la méthylation ciblée de certains sites. Ainsi, une méthode de séquençage est actuellement développée au laboratoire, qui permet de mettre en évidence les CpG méthylées, grâce à un traitement préalable de l'ADN au bisulfite (FROMMER et al., 1993). L'application de cette méthode au DNA génomique va permettre d'établir et de comparer le profil de méthylation du promoteur du gène endogène des différentes lignées et de le confronter au niveau d'expression basale et régulée, propre à chaque lignée.

PUBLICATIONS

BROQUA P., BENYASSI A., GROUSELLE D. et ARANCIBIA S. (1993). *Antidepressant/anxiolytic ipsapirone inhibits cold-induced hypothalamic TRH release.* (*Neuroendocrinology*, Neuroreport 4, 1200-1202).

NGO V., LAVERRIÈRE J.N. et GOURDJI D. (1993). *Binding capacity and cis-acting efficiency of DNA regulatory sequences can be distinguished in an in vivo competition assay.* (*Nucleic Acids Research*, 21, 5795-5796).

JACQUEMIN P., OURY C., PEERS B., MORIN A., BELAYEW A. et MARTIAL J.A. (1994). *Characterization of a single strong tissue-specific enhancer downstream from the three human genes encoding placental lactogen.* (*Mol. Cell Biol.*, 14, 93-103).

TOUGARD C. et TIXIER-VIDAL A. (1994). *Lactotropes and Gonadotropes. Chapitre dans « Physiology of Reproduction » edited by E. KNOBIL and J.D. NEILL.* (Raven Press, 2^e édition, volume 29, pp. 1711-1747).

VILA-PORCILE E., PICART R. et TOUGARD C. (1994). *Adaptation of the reverse hemolytic plaque assay to electron microscopy : A study of the individual secretory activity in prolactin cell subpopulations.* (*J. Histochem. Cytochem.*, 42, 11-22).

CHESNEAU V., PIEROTTI A.R., BARRE N., CREMINON C., TOUGARD C. et COHEN P. (1994). *Isolation and characterization of a dibasic selective metallo-endopeptidase from rat testes that cleaves at the amino terminus of arginine residues.* (*J. Biol. Chem.*, 269, 2056-2061).

GROUSELLE D., ROLAND J., ROUSSELET A., DENOULET P., CAZENAVE P.A., TIXIER-VIDAL A. et GOURDJI D. (1994). *Production and characterization of polyclonal anti-idiotypic anti-TRH antibodies : application to the study of pituitary TRH receptor.* (*Neuroendocrinology*, 59, 495-504).

PASSEGUÉ E., LAVERRIÈRE J.N. et GOURDJI D. (1994). *Thyrotropin-Releasing hormone stimulates in parallel jun B and c-fos messenger ribonucleic acids in GH3B6 pituitary cells : comparison with PRL secretion.* (*Mol. Cell. Neurosci.*, 5, 109-118).

GOURDJI D. et LAVERRIÈRE J.N. (1994). *The rat prolactin gene : a target for tissue-specific and hormone-dependent transcription factors.* (*Mol. Cell. Endocrinol.* 100, pp. 133-142).

OZAWA H., PICART R., BARRET A. et TOUGARD C. (1994). *Heterogeneity in the pattern of distribution of the specific hormonal product and secretogranins within the secretory granules of rat prolactin cells.* (*J. Histochem. Cytochem.*, 42, 1097-1107).

CROISSANDEAU G., GROUSELLE D., YUAN LI J., ROCHE M., PEILLON F. et LE DAFNIET M. (1994) *Hypothyroidism increases TRH and TRH precursor levels in rat anterior pituitary.* (*B.B.R.C.*, 201, 1248-1254).

CONGRÈS

Club des Modulateurs, Paris, 19 mai 1993. Communication orale : E. PASSEGUÉ.

40th Meeting of the European Tissue Culture Society, Rennes, juillet 1993. D. GOURDJI.

Sixth International Prolactin Congress, Cité des Sciences, La Villette, Paris, 30 août-3 septembre 1993. Communication orale : V. NGO et J.N. LAVERRIÈRE Communications affichées : E. PASSEGUÉ, D. GOURDJI, A. MORIN, C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE, N. BRUNET DE CARVALHO, L. MULLER, H. OZAWA, A. BARRET, G. BOULLA, R. PICART (*Neuroendocrinology*, 58, S1).

XXII^e Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Louvain, Belgique, 8-10 septembre 1993. D. GOURDJI et V. NGO : Communication orale.

Société de Biologie, Paris, Séance du 20 octobre 1993 sur la sécrétion des protéines. C. TOUGARD, Conférencière invitée.

Club de l'Hypophyse, Paris, 3 décembre 1993. E. VILA-PORCILE. D. GOURDJI - Conférencière invitée.

Colloque de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire en association avec la Société de Biologie Cellulaire de France, Paris, 7-9 décembre 1993, Villepinte. C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE, A. MORIN, D. GOURDJI, N. BRUNET DE CARVALHO, J.N. LAVERRIÈRE, V. NGO, E. PASSEGUÉ, L. MULLER.

Colloque joint SFG/SBCF, Paris, 17-18 mars 1994. E. VILA-PORCILE, C. TOUGARD, A. BARRET, L. MULLER.

Réunion du Club Français de l'Hypophyse, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, 27 mai 1994. Communication orale : D. GROUSELLE.

Conférence Jacques Monod : « Les mécanismes de l'Exocytose », La Londeles-Maures, 29 mai-2 juin 1994. L. MULLER.

3^e Colloque de la SOFcTEC, Paris, 3 juin 1994. D. GOURDJI (Chairman), E. PASSEGUÉ, G. BOULLA.

ENSEIGNEMENT

D. GOURDJI

— Faculté de Médecine des Cordeliers (Diplôme Européen d'Etudes Scientifiques Spécialisées (DEESS), Programme habilité Ministère de l'Education Nationale et Interuniversitaire de coopération (Erasmus), Modèles cellulaires in vitro : Application de l'évaluation des xénobiotiques, 4 heures CM.

— Université de Paris VI, Faculté des Sciences, Modules de Neuroendocrinologie Cellulaire, Maîtrise, 6 heures CM. 2^e.

— Faculté de Médecine Lariboisière-St-Louis, Université de Paris VII, Certificat (C2) de Pharmacologie Endocrinienne, 3 heures CM.

C. TOUGARD

— Université de Paris VI, Physiologie de la Reproduction, 3^e cycle, CM + encadrement des séminaires bibliographiques de 2 étudiants, 4 heures.

— Université de Paris XI, Endocrinologie et Interactions Cellulaires, 3^e cycle, CM + encadrement des séminaires bibliographiques de 2 étudiants, 4 heures.

DIPLOME DEA

— S. OUKHERFELLA - DEA Physiologie de la Reproduction soutenu le 6 septembre 1993.

THÈSE

— D. GROUSELLE - Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles « Approches immunologiques de l'étude de la biosynthèse et du récepteur de la thyrolibérine (TRH) », 20 décembre 1993.