

Biochimie cellulaire

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

Cours : Division et différenciation cellulaires

L'arrêt des divisions cellulaires est souvent le pré requis de la différenciation. En d'autres termes, division et différenciation somatique sont fréquemment des états du développement exclusifs. Afin de mieux comprendre la nature de leurs inter-relations, il était donc nécessaire d'analyser les mécanismes biochimiques que sous-tend le cycle des mitoses cellulaires, ainsi que les signaux qui interviennent au cours du développement pour mettre fin à ce cycle et déclencher l'expression du programme de différenciation du tissu considéré.

Les tissus dont sont constitués les organismes multi cellulaires présentent des caractéristiques variées en termes de potentialités de renouvellement. Ainsi, les neurones, les cellules de cristallin, le tissu cardiaque sont non renouvelables une fois atteint l'état de différenciation, soit qu'ils entrent dans un état de mort cellulaire complète (apoptose) soit qu'ils présentent un état post mitotique, avec maintien des aptitudes transcriptionnelles. A l'autre extrême existent des tissus à renouvellement continu (cellules sanguines, cellules du derme, ...) qui sont capables d'acquérir leur phénotype différencié tout en maintenant un état mitotique défini. Enfin d'autres tissus (muscles, tissu hépatique) présentent des capacités de renouvellement occasionnel lorsqu'entrent en jeu certaines conditions physiologiques (stress, traumatisme, etc.). Les cellules correspondantes ne se différencient qu'après l'arrêt des divisions mais le tissu qu'elles composent peut alors se reformer soit à partir de cellules souches quiescentes (muscle) soit par simple « duplication » des cellules adultes déjà différenciées (cas du tissu hépatique).

Le cycle mitotique chez les cellules eucaryotiques comprend plusieurs phases successives : on distingue la mitose proprement dite (phase M) au cours de laquelle le noyau se divise : on assiste à une condensation du matériel nucléaire conduisant à la formation des chromosomes, à la fragmentation longitudinale de

ces derniers et à la séparation des chromosomes fils ce qui double l'assortiment chromosomique, prélude à une cytodierèse, ou division cytoplasmique. La phase M est suivie d'une interphase. Celle-ci débute par une période au cours de laquelle les activités biosynthétiques, réduites lors de la phase M reprennent avec intensité (phase G_1). Une fois terminée cette période intermédiaire, la synthèse de l'ADN reprend (phase S) pour s'interrompre à nouveau après doublement du contenu en ADN du noyau, chaque chromosome étant alors converti en 2 chromatides identiques. Les cellules entrent ensuite en phase G_2 , puis la mitose proprement dite se déclenche à nouveau. La durée respective de chaque étape du cycle varie d'une cellule à l'autre, en fonction de la nature des tissus et de l'espèce, cette variabilité se traduisant par des changements dans la durée de la phase G_1 .

De nombreux facteurs de régulation du cycle mitotique ont été caractérisés. Ainsi, ont été mis en évidence : des *activateurs* de la phase S qui ont le pouvoir de déclencher la réplication prématurée de l'ADN chez des cellules en phases M, des *facteurs cytoplasmiques qui retardent* la mitose tant que se poursuit la synthèse d'ADN, un *facteur promoteur de mitoses* (ou facteur MPF : Mitotic Phase Promoting Factor), dont la production est sous contrôle du facteur précédent. Le MPF fut initialement découvert dans les œufs non fécondés du Xénope. L'injection artificielle de ce facteur dans des ovocytes en phase G_2 déclenche la phase M. En fait, le MPF est une protéine kinase qui ne devient active qu'une fois combinée à une autre protéine activatrice, la *cycline*, et que l'on dénomme pour cette raison, cdK (cyclin-dependent Kinase). Comme on le verra ci-après, chaque étape du cycle mitotique est sous la dépendance de divers types de complexes « cyclines-cdK », le caractère « oscillateur » de la division étant lié à des alternances dans les taux de dégradation des cyclines. Bien que ces cyclines soient synthétisées à taux élevé tout au long du cycle, elles sont rapidement dégradées en phase M.

Dans le présent cours, on s'est donc attaché à analyser les étapes moléculaires de la mitose dans deux modèles : la cellule de levure, et la cellule animale. L'étude des cycles mitotiques chez les levures (bourgeonnantes ou fissipares) a permis de caractériser un très grand nombre de mutants qui présentent des altérations ou des états de blocage à diverses phases du cycle. Il s'agit, dans la majorité des cas, de mutants thermosensibles baptisés « cdc ». L'analyse fine de leur comportement a permis de comprendre comment peut s'établir un état harmonieux entre « croissance » cellulaire proprement dite et division du noyau. Il existe en particulier une étape critique au cours de la phase G_1 (appelé « point de restriction » dans le cas des mammifères) tel qu'une fois franchie, le déroulement des événements divisionnels ultérieurs n'est plus influencé par les facteurs extérieurs. Les cellules peuvent régler la durée de leur état de « résidence » en G_1 de manière à ne franchir l'étape critique qu'après avoir atteint une taille cytoplasmique standard. Deux gènes « cdc », (le gène cdc_{28} chez la levure bourgeonnante, et

cdc_2 chez la levure fissipare) règlent le franchissement du « point critique » et l'initiation de la mitose suivante : les gènes cdc_2 et cdc_{28} codent en réalité pour des entités moléculaires qui sont les homologues des protéines kinases du facteur MPF des vertébrés.

Chez *S. cerevisiae* la transition $G1 \rightarrow S$ a été analysée en détail. Il existe une protéine *cdK unique* de 34 KDa codée par cdc_{28} , baptisée $p34cdc_{28}/cdc_2$, ou encore *cdK1*. En revanche, la nature des cyclines varie avec l'état du cycle mitotique de sorte que des complexes holoenzymatiques différents catalysent les diverses étapes de ce cycle.

En G_1 , interviennent trois cyclines (Cln_1 , Cln_2 , Cln_3). Le complexe Cln_3-cdc_{28} est présent pendant toute la phase G_1 , l'activité kinase de ce complexe permet tant l'activation transcriptionnelle des gènes codant pour les deux autres cyclines, Cln_1 et Cln_2 . Les protéines qui en résultent s'associent alors à cdc_{28} et les nouveaux complexes ont un effet auto-activateur vis à vis des gènes codant pour les deux cyclines. Une fois accrue l'activité de l'ensemble $Cln-cdc_{28}$, à la phase G_1 tardive, intervient le déclenchement (start) d'entrée en phase S.

Deux autres types de cyclines (Clb_5 et Clb_6), également synthétisées en G_1 tardif et dégradées en fin de mitose, sont requises après l'étape d'engagement pour le démarrage effectif (ou initiation) de la réplication de l'ADN.

Un autre mode de contrôle est également mis en œuvre : en effet les activités « kinasiques » (phosphorylantes) des complexes $Clb-Cdc_{28}$ sont maintenues en veilleuse par un facteur d'inhibition, $p40^{sic-1}$ accumulé en G_1 précoce, et qui se dégrade juste avant la phase S. Cette dégradation est déclenchée à la faveur d'une phosphorylation du facteur $p40^{sic-1}$ par Cln_1 ou Cln_2-cdc_{28} , en présence d'ubiquitine.

Chez les mammifères, comme chez la levure, c'est la mise en œuvre de divers types de complexes cyclines-cdk qui contrôle la succession des événements mitotiques. Toutefois s'il existe comme chez la levure, plusieurs types de cyclines, dont la nature varie selon les étapes du cycle, il existe également et contrairement à ce que l'on observe chez la levure, plusieurs types de cdk, également variables selon ces mêmes étapes, de sorte que les combinatoires envisageables sont plus variées. En se limitant à la transition $G1 \rightarrow S$, on connaît par exemple 3 types de cyclines D (D_1 , D_2 , D_3) qui peuvent se combiner en G_1 précoce, soit à cdK_4 , soit à cdK_6 . A une phase plus tardive de G_1 , c'est une autre cycline, la cycline E, qui s'associera à cdK_2 . Quand les cellules entrent en phase S, la cycline E se dégrade, libérant ainsi la protéine cdK_2 à laquelle elle était associée. Se forme alors un nouveau complexe cycline A- cdK_2 actif pendant la phase S. Enfin c'est une cycline B qui opère en phase M. En réalité les protéines kinases cdK_2 et cdK_4 ne requièrent pas seulement pour devenir actives, leur association avec les cyclines appropriées mais doivent également subir une phosphorylation (au niveau d'un résidu threonine) par l'entremise d'un autre complexe, baptisé *CAK*, (comprenant une cycline spéciale, la cycline H, associée à une protéine kinase

distincte cdK_7). On mesure à travers cet exemple toute la complexité et le raffinement moléculaire qui interviennent dans la régulation fine de la transition $G_1 \rightarrow S$ chez les mammifères.

Comment fonctionnent les complexes cycline-cdK et quelles étapes de la division se trouvent de fait sous leur contrôle ?

Schématiquement, et pour nous en tenir aux mécanismes intervenant lors de la transition $G_1 \rightarrow S$, il a été établi que l'hétérodimère cycline D-cdK₄ agissait en tant qu'élément catalysant la levée d'inhibition exercée sur des facteurs activant la réplication. La « cascade » suivante a été mise en évidence : l'hétérodimère activé par CAK, phosphoryle la protéine pRb (produit du gène Rb, dit de rétinoblastome) et en entraîne l'inactivation. Or, la protéine pRb se trouve associée dans la cellule au complexe E_2F-DP_1 lequel est un activateur général des gènes contrôlant la réplication (thymidylate kinase, DNA polymérase, etc). L'inactivation de pRb lève donc l'inhibition qu'exerçait cette protéine sur E_2F-DP_1 , facteurs de transactivation généralisée des enzymes de réplication. Ainsi la synthèse d'ADN peut elle être déclenchée.

L'action phosphorylante du complexe cycline D₁-cdK₄ est-elle même régulée de façon négative par toute une série de protéines telles que : P₂₁, P₂₇, Ink₄ etc. Seul de ces facteurs a effet négatif, P₂₁ est actif sur tous les complexes cyclines-cdK. Son expression est sous la dépendance d'un activateur p53, dont le gène entre en activité après lésion de l'ADN, lésions qu'entraînent notamment, les radiations ionisantes (ce qui explique incidemment leur effet de blocage à l'égard des divisions cellulaires).

Le cours a également porté sur les modes de régulation intervenant aux étapes qui font suite à la transition $G_1 \rightarrow S$, à savoir la phase S proprement dite, la phase G₂ et la phase M. Des mécanismes non moins complexes où entrent en jeu des combinaisons d'inhibiteurs, d'activateurs et de protéines kinases ont été mis en évidence dans ces dernières années. Le rôle des facteurs oncogéniques et mitogéniques a également été abordé.

Enfin on s'est intéressé au problème de l'incompatibilité entre division et différenciation, tel qu'elle se manifeste au cours du développement de la cellule musculaire. Trois types d'observations récemment effectuées éclairent d'un jour nouveau ce problème : 1) Le rôle de la protéine pRb dans le maintien de l'état post mitotique des noyaux après formation des myotubes, rôle mis en évidence grâce à l'étude des myotubes provenant de souris homozygotes Rb (-/-). 2) L'effet inducteur exercé par le facteur myogénique, MyoD, dans l'expression du gène p₂₁. 3) L'action phosphorylante du complexe cycline cdK₄ vis à vis du facteur MyoD. Les observations 2 et 3 rendent désormais compte des phénomènes d'arrêt du cycle mitotique au cours du cycle cellulaire et expliquent pourquoi les facteurs myogéniques demeurent inactifs dans les myoblastes en division.

PROFESSEURS INVITÉS

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

P.W.J. RIGBY (National Institute for Medical Research, Londres) : *Transcriptional regulation during murine embryogenesis : - How do cells know where they are and what they are ?*

H. SOREQ (Professeur à l'Université Hébraïque de Jérusalem ; Israël) : 1. *Transiently transgenic Xenopus tadpoles - an in vivo model for engineering neuromuscular junction development.* 2. *Experimental introduction of progressive cholinergic deficits in transgenic mice overexpressing human acetylcholinesterase.* 3. « Antisense » *inhibition of acetylcholinesterase gene expression : a biomedical approach for controlling blood cells proliferation and neuronal differentiation.* 4. *Genetic predisposition to adverse consequences of anticholinesterase therapies anticipated in carriers of the « atypical » butyrylcholinesterase mutation.*

R. WEIL (Professeur à l'Université de Genève) : *A simplifying concept for experimental and clinical cancer research : the development of carcinomas is primarily linked to errors in stem cell differentiation.*

D'autres professeurs ont donné un séminaire au laboratoire :

P. BARTLETT (Walter and Eliza Institute of Medical Research, Royal Melbourne Hospital, Victoria ; Australia) : *The regulation of neuronal precursors in the embryonic and adult brain.*

Y. BERWALD-NETTER (Collège de France, Laboratoire de Biochimie Cellulaire, Paris) : *Les isoformes des canaux sodiques voltage-sensibles des cellules neuronales et gliales : polymorphisme, spécificité cellulaire et développement.*

H.M. BLAU (Stanford University School of Medicine, Department of Molecular Pharmacology, Stanford ; USA) : *Riboregulators : untranslated RNA sequences with a role in growth, differentiation and tumorigenicity.*

P. CALISSANO (Consiglio Nazionale Ricerche, Istituto di Neurobiologia, Rome ; Italie) : *Différenciation terminale in vitro et mort programmée des cellules granulaires du cervelet : rôle du calcium et de facteurs épigénétiques.*

W.A. CATTERALL (Department of Pharmacology, University of Washington, Seattle ; USA) : 1. *Molecular mechanisms of inactivation and modulation of sodium channels.* 2. *Molecular determinants of brain calcium channel function.*

P. DENOULET (Collège de France, Laboratoire de Biochimie Cellulaire, Paris) : *Polymorphisme de la tubuline neuronale et régulation de la liaison des MAP's.*

P. GRUSS (Department of Molecular Cell Biology, Max-Planck-Institute of Biophysical Chemistry, Göttingen ; Germany) : *Le rôle des gènes Pax dans le développement du système nerveux.*

C. HALLONET (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Laboratoire du Professeur Klaus Weber, Göttingen) : *Propriétés fonctionnelles du domaine carboxy-terminal de la protéine NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus).*

V. MOURA NETO (Instituto de Biofisica Carlos Chagas Filho, Rio de Janeiro) : *Hétérogénéité des astrocytes : interactions avec les neurones et sécrétion de facteurs.*

D. PINTO-HENRIQUE (Developmental Biology Unit, Department of Zoology, Oxford, U.K.) : *Delta notch signalling in vertebrate neurogenesis.*

O. PONGS (Zentrum für Molekulare neurobiologie, Institut für Neurale Signal Verarbeitung, Hamburg ; Allemagne) : *Signalisation calcique et activité des canaux potassiques en relation avec l'activité synaptique.*

M. M. PORTIER (Collège de France, Laboratoire de Biochimie Cellulaire, Paris) : *Régulation de l'expression de la périphérine, protéine neuronale des filaments intermédiaires.*

P. ROUGET (Collège de France, Laboratoire de Biochimie Cellulaire, Paris) : *Identification du gène NPDC-1 qui intervient dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules neurales.*

F. SLADDECZEK (Institut Alfred Fessard, CNRS, Gif-sur-Yvette) : *Cdks (cyclin dependent kinases) dans le système nerveux central.*

H. SOREQ (The Institute of Life Sciences, Dept of Biological Chemistry, Jerusalem ; Israël) : *Etude de la neurogenèse in vivo et ex vivo : surexpression et inhibition de l'acétylcholinestérase par transgenèse.*

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Na-G - un nouveau canal sodique neuro-glial : localisation cellulaire des ARNm. (Y. BERWALD-NETTER, H. CAMBIER, G. DOS SANTOS, M. ESCURAT, S. GAUTRON, C. GRUSZCZYNSKI, E. HOUZET-AMIGOU, A. KOULAKOFF, K. KRUGER, B. LESAFFRE).

Un ADNc correspondant à une nouvelle forme de canal sodique fut isolé par clonage à partir d'une banque d'ADNc poly A⁺ d'astroglie. La séquence clonée comprend 6 847 paires de bases, avec une région 5' non codante de 244 nucléotides, un cadre de lecture ouvert de 5040 nucléotides et une région 3' non codante de 1 563 nucléotides. Le cadre de lecture prédit une protéine de 1 680 acides aminés pour une masse moléculaire de 192 180 Da. Le profil hydropathique de la protéine indique une organisation interne semblable aux autres canaux sodiques : 4 domaines homologues, chacun comprenant 6 segments hydrophobes (S1-S6) pouvant former des α -hélices et 2 segments hydrophobes plus courts (SS1-SS2), reliant les segments S5 et S6, pouvant former des feuillettes β transmembranaires ; tous sont reliés par des segments hydrophiles, extra- ou intra-cellulaires.

L'analyse fine de la structure primaire de Na-G, comparée avec celles des isoformes cérébrales ou musculaires a révélé qu'il s'agit d'une molécule originale, qui présente une homologie moyenne de 50 % avec les autres isoformes, cérébrales ou musculaires de canaux Na et de 73 % avec le canal « atypique » hNav2.1 du muscle cardiaque de l'homme, mis en évidence récemment par Tamkun et col.

La distribution tissulaire des ARNm Na-G, explorée initialement par hybridation en Northern blot, montra un taux élevé de messagers dans les ganglions du système nerveux périphérique, un taux faible dans le cerveau et un taux intermédiaire dans la moelle épinière (Gautron et al., 1992). Nos travaux récents avaient pour objectif de préciser la localisation cellulaire de ces messagers dans le système nerveux central et périphérique. Les expériences d'hybridation *in situ* de sondes cARN à des coupes histologiques donnèrent des résultats inattendus quant à la spécificité cellulaire des ARNm Na-G *in vivo* : dans le cerveau, les cellules riches en messagers Na-G sont des neurones, situés dans des régions bien circonscrites, connues pour leur importance dans la transmission et le traitement des informations sensorielles. Il s'agit des neurones relais de plusieurs noyaux du thalamus dorsal, impliqués dans l'acheminement des signaux sensoriels de la périphérie vers le cortex cérébral. Un taux plus faible de ces messagers a été trouvé dans deux autres types de neurones relais — les neurones pyramidaux de l'hippocampe et les cellules de Purkinje du cervelet. De manière surprenante, les messagers Na-G ne sont pas décelables par hybridation *in situ* dans la glie centrale. En cela, les tancytes de l'éminence médiane, très riches en ARNm Na-G, représentent une exception notable.

Les ARNm Na-G ne sont pas décelables par hybridation *in situ* ni dans les neurones ni dans la glie de la moelle épinière ; seules les cellules de Schwann dans les racines dorsales et ventrales de la moelle sont fortement marquées. En effet, dans le système nerveux périphérique, les ARNm Na-G sont exprimés à la fois dans les cellules gliales et les neurones des ganglions sensoriels et des ganglions sympathiques. Cependant tandis que dans les neurones sympathiques la teneur en ARNm est relativement homogène, dans les neurones sensoriels, elle varie notablement d'un neurone à l'autre. La vaste majorité des cellules de Schwann expriment fortement ces messagers : leur visualisation par hybridation *in situ* s'est même avérée un excellent moyen pour révéler les nerfs périphériques. Dans les nerfs sensori-moteurs — tel le nerf sciatique où certains axones sont myélinisés et d'autres non —, on trouve une sous-population de cellules de Schwann exemptes d'ARNm Na-G. Les travaux en cours sont destinés à explorer la relation entre l'expression de ces ARNm et le phénotype myélinisant ou non myélinisant des cellules de Schwann.

La structure primaire et la distribution tissulaire inhabituelle du canal Na-G indiquent clairement que celui-ci appartient à une nouvelle catégorie de canaux Na voltage-sensibles qui, en raison de leur homologie de séquence, comprend

également le canal cardiaque hNav2.1. Tandis que les autres variants de canaux Na sont exprimés préférentiellement sinon exclusivement dans des cellules excitables — neurones et myocytes — Na-G est abondant dans des cellules réputées non-excitables, telles les cellules de Schwann. La question de sa finalité physiologique reste donc à résoudre.

L'hypothèse la plus simple est celle d'un rôle dans l'homéostasie sodique. La Na/K-ATPase en est un élément clef. Or son activité est fortement dépendante de la concentration intracellulaire en ions sodium. Aussi, on peut envisager l'implication des canaux Na-G dans le contrôle local de la concentration en ions sodium ou même d'un couplage fonctionnel entre les canaux Na-G et la Na/K-ATPase. Alternativement, l'activation des canaux Na-G, avec la dépolarisation locale qui en résulte, pourrait conduire à l'activation d'autres types de canaux voltage-dépendants (canaux Na classiques, canaux K, canaux Ca) et constituer ainsi une phase précoce dans une cascade d'événements de signalisation et/ou des réactions métaboliques.

On remarquera que les neurones qui expriment les messagers Na-G sont principalement ceux qui participent à la transmission et/ou l'élaboration des réponses aux stimuli sensoriels. Ces neurones manifestent des activités oscillatoires. Malgré de nombreux travaux sur la nature des courants ioniques qui sous-tendent ces oscillations, les mécanismes de leur déclenchement demeurent énigmatiques. L'activité du canal Na-G ferait-elle partie de ces mécanismes ? Une approche prometteuse pour l'appréhender consiste à examiner le comportement physiologique de cellules provenant d'animaux dans lesquels l'activité du gène Na-G serait abolie par recombinaison homologe. Une collaboration en ce sens est entreprise avec le Prof. M. Noda (Okazaki).

Expression, structure et fonctions des protéines microtubulaires

(Ph. DENOULET, D. BOUCHER, E. DESBRUYERES, B. EDDE, J.C. LARCHER, S. LAZEREG ET C. REGNARD).

1. Régulation des interactions entre tubulines et MAP's. Rôle de la polyglutamylation

Nous avons précédemment montré que la chaîne polyglutamylée de la tubuline est impliquée dans la régulation des interactions entre la tubuline et Tau ou MAP2 (MAPs structurales). Les domaines C-terminaux non modifiés de la tubuline exercent une inhibition constitutive de la liaison de ces MAPs. Cette inhibition est levée progressivement dans un premier temps par l'addition séquentielle des trois premières unités glutamyles de la chaîne polyglutamylée puis restaurée progressivement dans un deuxième temps par l'addition des trois unités suivantes.

En utilisant des « têtes » de kinésine (domaine ATPasique moteur) dans des expériences d'interaction *in vitro* sur membrane, nous avons montré que la poly-

glutamylation contrôle également la liaison de ces MAPs motrices sur la tubuline. Des expériences préliminaires suggèrent en outre qu'il n'y a pas de relation précise entre le type de kinésine utilisé (moteur antérograde pour une kinésine conventionnelle ou rétrograde pour une kinésine apparentée, ou KRP) et l'interaction avec une sous-unité α ou β -tubuline précise. Par des expériences de compétition et de déplacement, nous avons montré que les MAPs structurales et motrices, qui interagissent essentiellement par des liaisons ioniques, se lient dans le même domaine C-terminal de la tubuline mais en des sites distincts. La caractérisation précise des motifs peptidiques de reconnaissance et de liaison entre les deux partenaires protéiques est en cours d'étude.

2. Etude des enzymes de glutamylation

Compte tenu de l'importance de la polyglutamylation dans les structures microtubulaires du neurone et dans la régulation des interactions avec les MAPs motrices et structurales, nous avons entrepris l'étude des enzymes impliquées dans cette modification post-traductionnelle. Nous avons, au préalable, développé un test enzymatique *in vitro* de glutamylation en définissant les paramètres (pH, force ionique, effecteurs) permettant un transfert efficace de glutamate radioactif sur de la tubuline purifiée.

Des méthodes diverses de purification ont abouti à un enrichissement d'environ 100 fois de l'activité enzymatique. Certains paramètres essentiels de l'enzyme ont été déterminés (K_M vis-à-vis des différents substrats, activité préférentielle vis-à-vis de la tubuline polymérisée, ...). Nous ignorons encore s'il existe une ou plusieurs enzymes capables de glutamyliser les deux sous-unités, ou même les différents isotypes de chaque sous-unité.

Notre but à court terme est d'obtenir une fraction suffisamment homogène pour développer des outils (anticorps, ADNc) permettant d'aborder l'étude de la régulation de l'expression de l'enzyme. Ce développement devrait apporter des éléments essentiels pour comprendre la fonction de la polyglutamylation dans des systèmes biologiques extrêmement divers. Stabilité du centrosome, motilité flagellaire, extension et maintien des prolongements axo-dendritiques et transport axonal ne sont que quelques exemples dans lesquels la polyglutamylation semble en effet jouer un rôle clé.

Régulation ontogénique et fonction des isozymes de l'énolase dans les tissus nerveux et musculaire

(M. LAZAR, S. BROSSET, D. GROS, C. JABET, A. KELLER, N. LAMANDÉ, M. LUCAS, T. MERKULOVA, J.D. ROUZEAU)

L'énolase, enzyme de la voie glycolytique, existe sous plusieurs formes isozymiques dimériques codées par des gènes différents, d'expression ontogénique et cellulaire spécifiques. Au stade adulte, les formes $\alpha\gamma$ et $\gamma\gamma$ de l'énolase sont exprimées essentiellement dans les neurones et les cellules neuroendocrines, et les

formes $\alpha\beta$ et $\beta\beta$ dans les myofibres striées et les cardiomyocytes, la forme embryonnaire $\alpha\alpha$ restant exprimée seule, à des niveaux variables selon les tissus, dans la plupart des autres types cellulaires. Ce système isozymique est ainsi un modèle expérimental favorable pour étudier certains des mécanismes génétiques et épigénétiques impliqués dans la mise en place et le maintien du phénotype mature des cellules nerveuses et musculaires. En recherchant la signification physiologique de l'expression d'iso-énolases distinctes dans les cellules neuronales et musculaires on peut également contribuer à la caractérisation des mécanismes intégrés qui optimisent la production et l'utilisation de l'ATP dans les cellules différenciées. Dans le cadre de ces objectifs globaux, nous avons cette année développé plus particulièrement les thèmes suivants :

1. Expression et régulation des iso-énolases dans les cellules nerveuses

1. a) Expression de l'énolase γ au cours de la différenciation des oligodendrocytes en culture et *in vivo*

Nous avons précédemment observé, en collaboration avec l'équipe de Y. Berwald-Netter, que des cultures primaires de fibroblastes ou d'astrocytes contenaient de faibles quantités de transcrits et de sous-unité γ . La présence d'un faible niveau de sous-unité γ dans de nombreux types cellulaires autres que les neurones ou les cellules neuroendocrines a été également démontrée *in vivo*. Par contre, la différenciation, en milieu défini, des précurseurs O-2A en oligodendrocytes (collaboration avec l'équipe de M. Sensenbrenner, Strasbourg), s'accompagne d'une importante activation du gène γ , les niveaux d'ARNm et de sous-unité γ dans les oligodendrocytes différenciés devenant comparables à ceux de neurones en culture. Cette expression est négativement modulée par un facteur de croissance, le bFGF, qui stimule la prolifération des précurseurs et retarde leur différenciation. Ces résultats sont à rapprocher de l'expression transitoire de l'immunoréactivité γ que nous avons observée au moment de la myélinisation (8 jours après la naissance) dans les oligodendrocytes de plusieurs régions du cerveau de rat.

1. b) Expression différentielle des gènes α et γ dans deux catégories de neurones du ganglion spiral de la cochlée

Nous avons analysé l'expression des gènes de l'énolase dans le ganglion spiral de la cochlée par immunocytochimie et microscopie confocale, au cours du développement postnatal et chez l'adulte (collaboration avec C. Dechesne, INSERM U432, Montpellier). Ce ganglion de l'oreille interne présente deux populations neuronales bien identifiées : les neurones de type I (90-95 %) établissent des contacts avec les cellules ciliées internes, et les neurones de type II, plus petits, avec les cellules ciliées externes. Dans les neurones de type I, l'immunoréactivité α émolase disparaît entre P12 et P15, juste après l'établissement des contacts synaptiques adultes, et seule l'énolase γ est alors détectable. Par contre, les neu-

rones de type II maintiennent un niveau d'énolase α élevé au stade adulte. La persistance de l'expression de l'énolase α dans ces neurones pourrait être liée à un défaut d'activité électrophysiologique. En effet, au stade adulte, ces neurones ne semblent pas répondre aux stimulations acoustiques, contrairement aux neurones de type I. Ces observations suggèrent une corrélation entre activité neuronale et niveaux relatifs des produits des gènes α et γ .

2. Régulation de l'expression du gène de l'énolase spécifique des muscles striés (« gène β »)

Nos études précédentes ont montré que le gène β , tels ceux de la desmine ou des gènes régulateurs MyoD et myf5, est déjà faiblement exprimé dans les myoblastes en culture avant leur sortie du cycle cellulaire, la différenciation terminale en myotubes s'accompagnant d'un accroissement du niveau des transcrits β . Nous avons montré que ces deux niveaux d'expression reflètent deux régimes d'activité transcriptionnelle du gène β , sans modification de la stabilité métabolique des transcrits (Lamandé *et al.*, sous presse). Nous avons aussi mis en évidence l'existence d'un second ARNm β plus long de 110 b, transcrit *in vivo* et en culture à partir du même site d'initiation de la transcription que l'ARNm majoritaire précédemment caractérisé et résultant d'un épissage différentiel dans la région 5' non traduite. La région promotrice unique n'est fonctionnelle dans les myotubes qu'en présence d'une séquence présente dans le premier intron, qui a les propriétés d'un amplificateur musculaire. Par analyse délétionnelle, mutagenèse dirigée, expériences de trans-activation, et analyse des interactions ADN-protéines, nous avons délimité l'activité de cet amplificateur - telle qu'on peut l'évaluer dans les lignées myogéniques en culture - dans une région de 50 pb incluant deux sites de liaison pour des facteurs nucléaires des familles MEF2 et MyoD et une région riche en A + T ne correspondant à aucun facteur précédemment connu. Les motifs proximaux indispensables à l'activité de l'amplificateur sont des sites de fixation de facteurs appartenant aux familles NF1 et Sp1. Ces études en culture fournissent une base précise à l'exploration des mécanismes de régulation transcriptionnelle du gène de l'énolase β au cours du développement musculaire *in vivo* que nous allons maintenant entreprendre par transgénèse.

Etude de la tyrosine hydroxylase et des décarboxylases d'acides aminés conduisant à des neuromédiateurs

(J. THIBAUT, M. KRIEGER, F. JEBAI, Y. TILLET, A.A. BATTAGLIA, C. DOUBININE)

1. Clonage de la tyrosine hydroxylase (TH) de mouton

La tyrosine hydroxylase est un marqueur essentiel de la voie catécholaminergique, c'est pourquoi plusieurs laboratoires ont clonés l'ADNc de cette enzyme

chez le rat, le bœuf et l'homme entre autres. Chez le mouton, au niveau moléculaire, aucune information concernant cette protéine n'a encore été obtenue ; on sait seulement que les anticorps anti TH de rat reconnaissent la protéine du mouton. Avec l'anticorps anti TH, nous avons exploré une banque de cDNA de glandes médullo-surrénale de mouton réalisée dans le phage λ gt11. Après avoir isolé plusieurs clones positifs, nous en avons déterminé la séquence nucléotidique. La partie 5' de l'ARNm de la TH de mouton n'a pu être retrouvée dans la banque de clones, elle a donc été fabriquée par la technique de reverse transcription puis amplifiée par PCR (RT-PCR) à partir d'éléments de séquences de mouton et d'une séquence non-codante de l'ARNm de bœuf. La séquence codante complète de l'ARNm de la TH de mouton a pu être reconstituée et déterminée ; elle est très semblable à celle du bœuf, de l'homme et du rat. Cet ADNc constitue un matériel de départ à partir duquel des sondes ADN ont été fabriquées : deux approches sont en cours de réalisation, l'une par hybridation sur membranes de nylon : le dosage de l'ARNm permet d'analyser les variations de l'ARNm de la TH au cours du cycle sexuel du mouton et l'autre par hybridation « *in situ* » sur coupes d'encéphales donnant la possibilité de localiser les aires de synthèse de l'ARNm de cette enzyme et de le quantifier au cours du cycle œstrien de la brebis.

2. Etude de la DOPA décarboxylase (AADC) au cours de l'embryogénèse

A l'aide d'un antisérum anti AADC préparé au laboratoire par injection au lapin d'une protéine de fusion β -galactosidase-AADC, nous avons étudié l'apparition de l'AADC au cours de la vie embryonnaire du rat confirmant les travaux antérieurs de Jaeger et Teitelman pour ce qui concerne les systèmes nerveux central et périphérique et mettant en évidence des expressions transitoires qui pourraient avoir une importance dans l'organogénèse. Nous avons construit des sondes ARN anti-sens qui ont un pouvoir de détection de l'ARNm de l'AADC supérieur à celui du sérum anti AADC détectant la protéine. C'est par la technique d'hybridation *in situ* que nous allons étudier le rôle des deux ARNm de l'AADC. En effet, l'un d'eux pourrait être un ARN ubiquitaire qui s'exprime dans des tissus sans fonction neuronale. L'autre est spécifique des neurones il pourrait être impliqué dans un mécanisme d'autorégulation.

3. Etude de la structure de la protéine AADC

L'obstacle actuel à l'étude des structures des décarboxylases d'acides aminés à phosphate de pyridoxal réside dans la difficulté d'obtention des quantités nécessaires à la cristallisation de l'enzyme. Pour atteindre ce but, divers modes d'expression chez *E.coli* sont en cours d'étude. Le plasmide pMal permet d'obtenir une protéine de fusion Maltose Binding Protein-AADC (MBP-AADC) active. La présence d'un site de protéolyse du facteur Xa, à la jonction des deux pro-

téines, devait permettre de séparer les deux protéines ; cependant le facteur Xa provoque une importante protéolyse de l'AADC sans couper au site prévu.

Des expressions de la protéine ont alors été effectuées en direct à l'aide du vecteur pET3a ; bien que peu exprimée, il a été possible d'isoler l'AADC active. Nous nous efforçons de déterminer les conditions optimales de production de cette protéine dont les paramètres enzymatiques sont identiques à ceux de la protéine isolée du phéocromocytome de rat. Le but ultime de cette recherche consiste à déterminer par mutagenèse dirigée les acides aminés impliqués dans le site enzymatique de la protéine.

4. *Etude de la régulation de l'expression de l'AADC : Choix des promoteurs*

En collaboration avec le laboratoire du Professeur Grivennikov à Moscou, nous étudions l'expression de l'AADC après transfection des promoteurs dans des cellules eucaryotes.

Après clonage au laboratoire des deux séquences promotrices correspondant à l'ARNm du foie d'une part et du système nerveux d'autre part, nous avons entrepris d'insérer ces promoteurs dans des lignées cellulaires afin de mesurer la force de chacun d'eux et d'isoler les facteurs nucléaires responsables de leur mise en jeu.

5. *Recherches immunocytologiques*

Plusieurs anti sérums ont été préparés au laboratoire, ils sont capables de caractériser certaines enzymes de synthèse de neuromédiateur (sérum anti TH, anti AADC et anti glutamate décarboxylases) ils donnent lieu à de nombreuses collaborations en France et à l'étranger. Un réseau d'échange a été établi avec l'INRA de Tours pour étudier la relation qui existe entre les catécholamines, la reproduction, et les phénomènes de stress chez le mouton.

Avec l'équipe du professeur M. Ugrumov de Moscou nous développons une collaboration sur l'ontogénèse des neurones à TH et à AADC dans l'hypothalamus du rat.

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

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

Notre étude du contrôle de la prolifération, de la transformation et de la différenciation des cellules gliales et neuronales nous a conduit à identifier une nouvelle protéine régulatrice, NPDC-1 (pour Neural Proliferation Differentiation Control-1).

Au départ, nous disposions de lignées cellulaires correspondant à divers types de précurseurs que nous avons immortalisés et dont nous pouvions contrôler la croissance et la différenciation. Après avoir étudié les propriétés de prolifération et de différenciation de ces cellules, nous avons orienté nos travaux vers la recherche de cDNAs codant pour des protéines susceptibles d'intervenir dans le contrôle de la prolifération et le déclenchement de la différenciation.

Dans cette recherche, nous avons utilisé deux critères pour pré-sélectionner les séquences qui pouvaient paraître intéressantes. Le premier était une expression différentielle des séquences selon l'état de croissance des cellules : nous avons recherché des séquences qui commencent à être exprimées préférentiellement lorsque les cellules atteignent juste la confluence, de façon à éviter de sélectionner des cDNAs correspondant simplement à l'expression de marqueurs de différenciation. Le second critère était l'hybridation de ces séquences avec des sondes apparentées à des séquences Hélice-Loop-Hélice de différentes classes : b-HLH, HLH sans région basique (*emc*, *hairy*, *Id*), b-HLH présentant des domaines de liaison aux membranes (famille SREBP). Sur la base de ces critères, nous avons cloné plusieurs cDNA correspondant à des messagers exprimés de manière différentielle selon l'état de croissance des cellules, dont l'un, NPDC-1 s'est révélé particulièrement intéressant.

En effet, le gène correspondant est exprimé spécifiquement dans les cellules neuronales et gliales en arrêt de division. Nous avons montré que ce gène code pour une protéine présentant : deux domaines apparentés à des séquences de type « Hélice-Loop-Hélice », un signal de localisation nucléaire, un domaine de liaison aux membranes proche de celui de SREBP et deux régions riches en PST comportant plusieurs sites consensus pour les MAP-kinases.

Nous avons étudié les conséquences de son expression après transfection dans différentes lignées cellulaires qui ne l'expriment pas de manière endogène. Ainsi, le transfert stable de vecteurs d'expression pour NPDC-1 dans des lignées transformées d'origine neurale et aussi d'origine non-neurale, conduit *in vitro* à une régulation négative de la prolifération et à une suppression de la transformation. Elle conduit aussi, *in vivo*, à la suppression des propriétés tumorigènes des cellules après transplantation chez la souris nude.

L'étude de l'expression de NPDC-1 *in situ* nous a également montré que NPDC continue à être exprimé fortement dans des neurones post-mitotiques. Une hypothèse est que NPDC, indépendamment de son rôle préalable dans l'arrêt des divisions, maintiendrait ces neurones dans leur état post-mitotique et différencié, tout en les protégeant de l'apoptose. Cette hypothèse est actuellement en cours d'étude.

Nous avons construit des vecteurs procaryotes conduisant à l'obtention de protéines de fusion entre NPDC-1 et la glutathion-S-transférase (GST) qui nous ont permis de produire la protéine de manière préparative puis d'obtenir des anticorps dirigés spécifiquement contre NPDC-1. Les protéines de fusion GST-

NPDC-1 permettent aussi d'immobiliser NPDC sur des microbilles de Glutathion-sépharose. A l'aide de ces protéines immobilisées, nous avons commencé à identifier quelques protéines interagissant avec NPDC. Ce travail a déjà montré l'existence d'interactions entre NPDC-1 et plusieurs couples cyclines-cdks.

Nous avons maintenant cloné les séquences génomiques *npdc-1*, mis en évidence 7 introns et obtenu 2kb de la région flanquante en 5' et 6kb de la région flanquante en 3'. L'extension de ce travail doit permettre d'examiner l'intervention d'épissages différentiels, et le rôle des différentes régions de NPDC dans les fonctions de la protéine. Ainsi, des séquences partiellement délétées pourront être d'une part transfectées de manière stable dans les cellules, d'autre part insérées entre les régions flanquantes puis intégrées par recombinaison homologue à la place du gène *npdc-1* sauvage.

PUBLICATIONS

1994

ANDRÉ C., DOS SANTOS G., KOULAKOFF A. (1994). Cultured neurons from mouse brain reproduce the muscarinic receptor profile of their tissue of origin. *Eur. J. Neurosci.*, 6, 1691-1701.

ANDRÉ C., DOS SANTOS G., KOULAKOFF A. (1994). Muscarinic receptor profiles of mouse brain astrocytes in culture vary with their tissue of origin but differ from those of neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 6, 1702-1709.

AUDEBERT S., KOULAKOFF A., GROS F., DENOULET P., EDDÉ B. (1994). Developmental regulation of polyglutamylated α - and β -tubulin in mouse brain neurons. *J. Cell Sci.* 107, 2313-2322.

BARICAULT L., DE NÉCHAUD B., SAPIN C., CODOGNO P., DENOULET P., TRUGNAN G. (1994). The network organization and the phosphorylation of cytoke-ratins are concomitantly modified by forskolin in Caco-2 cells. *J. Cell Sci.*, 107, 2909-2918.

BELTRAMO M., KRIEGER M., TILLET Y., THIBAULT J., CALAS A., MAZZI V., FRANZONI M.F. (1994). Immunolocalization of aromatic L-aminoacid decarboxylase in goldfish (*Carassius auratus*) brain. *J. of comparative Neurology*, 343, 209-227.

BERNARD R., LE BERT M., BORDE I., GALIANA E., EVRARD C., ROUGET P. (1994). immortalization of different precursors of glial cells with a targeted and temperature sensitive oncogene. *Exp. Cell Res.*, 214, 373-380.

BOUCHER D., LARCHER J.C., GROS F., DENOULET P. (1994). Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of *in vitro* interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin. *Biochemistry*, 33, 12471-12477.

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

KELLER A., BÉROD A., DUSSAILLANT M., LAMANDÉ N., GROS F., LUCAS M. (1994). Coexpression of alpha and gamma enolase genes in neurons of adult rat brain. *J. Neurosci. Res.* 38, 493-504.

N'GUYEN-LEGROS J., KRIEGER M., SIMON A. (1994). Immunohistochemical localization of L-DOPA and aromatic L-amino acid-decarboxylase in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. and Visual Science*, 35, 2906-2915.

TILLET Y., THIBAUT J., KRIEGER M. (1994). Aromatic L-amino acid decarboxylase immunohistochemistry in the suprachiasmatic nucleus of the sheep. Comparison with Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *Brain Research*, 648, 319-323.

WOLFF A., HOUDAYER M., CHILLET D., DE NÉCHAUD B., DENOULET P. (1994). Structure of the polyglutamyl chain of tubulin : Occurrence of α - and γ -linkages between glutamyl units revealed by monoreactive polyclonal antibodies. *Biol. Cell.*, 81, 11-16.

1995

BATTAGLIA A.A., FEUILLOLEY M., MULATERO B., BELTRAMO M., THIBAUT J., FRANZONI M.F., CALAS A., VAUDRY H., FASOLO A. (1995). Confocal microscopy analysis of NPY and TH immunoreactivities in the hypothalamo-hypophysial system of the frog. *Neurochemistry*, 6, 645-649.

BORDE I., EVRARD C., GALIANA E., ROUGET P. (1995). A permanent glial precursor cell line, immortalized with the adenovirus E1A gene, undergoes apoptosis in restrictive growth conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207, 630-636.

GALIANA E., VERNIER P., DUPONT E., EVRARD E., ROUGET P. (1995). 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*, 92, 1560-1564.

KELLER A., ROUZEAU J.D., FARHADIAN F., WISNEWSKY C., MAROTTE F., LAMANDÉ N., SAMUEL J.L., SCHWARTZ K., LAZAR M., LUCAS M. (1995). Differential expression of α and β enolase genes during rat heart development and hypertrophy. *Amer J Physiol-Heart Circ Phy.* (sous presse).

LAMANDÉ N., BROSSET S., LUCAS M., KELLER A., ROUZEAU J.-D., JOHNSON T.R., GROS F., ILAN J., LAZAR M. (1995). Transcriptional up-regulation of the

mouse gene for the muscle-specific subunit of enolase during terminal differentiation of myogenic cells. *Mol Reprod & Dev.* (sous presse)

LEBERT M., EVRARD C., GROS F., ROUGET P. (1995). Selective expression of the lacZ gene driven by the 2.3 kb neurofilament light chain promoter during early neural development of transgenic mice. *Transgenics* (1995), accepté pour publication.

UGRUMOV M.V., FETISOV S.O., EFUNI E. S., THIBAUT J., KRIEGER M. (1995). Differentiation of embryonic dopaminergic neurons of the mediobasal hypothalamus grafted into the 3rd ventricle of adults rats. *Neurosci. Lett.*, (soumis).

WAREMBOURG M., DENEUX D., KRIEGER M., JOLIVET A. (1995). Progesterone receptor immunoreactivity in aromatic L-aminoacid decarboxylase containing neurons of the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *J. of Comparative Neurology* (soumis).

DIPLÔMES D'ÉTUDES APPROFONDIES

I. SANSAL, « *Contribution à l'étude de NPDC-1, une protéine intervenant dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules nerveuses* ». Septembre 1994.

DIPLÔMES ET THÈSE DE DOCTORAT

S. BROSSET, « *Régulation de l'expression du gène murin de l'énolase β dans les cellules myogéniques en culture* », décembre 1994 (Thèse de Doctorat de l'Université Paris VII, spécialité « Génétique Humaine »).

J.D. ROUZEAU, « *Etude de l'expression des gènes codant pour les isozymes de l'énolase pendant le développement du cœur de rat et lors de l'hypertrophie cardiaque* », mai 1995 (Diplôme d'Ingénieur du C.N.A.M., spécialité « Biologie en vue des applications »).

S. AUDEBERT, « *Polyglutamylation de la tubuline : étude de la modification post-traductionnelle au cours de la différenciation neuronale* », septembre 1994 (Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie).

Ph. DENOULET, « *Polymorphisme protéique des tubulines dans la cellule nerveuse : expression et signification fonctionnelle* », mars 1995. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles (Université Pierre et Marie Curie).

CONFÉRENCES, INVITATIONS, PARTICIPATION À DES CONGRÈS

Le Professeur François GROS a donné une série de conférences et a participé aux manifestations suivantes :

Developmental genetics in somatic differentiation, Colloque « Diamond Jubilee seminar of the Indian National Science Academy », « Recent trends in Life Sciences », New Delhi, (8-12 janvier 1994).

Conférence donnée à Orléans sur invitation de l'Association pour l'Avancement des Sciences en relation avec le Muséum : *Les biotechnologies en 1994*, (Orléans ; 15 avril 1994).

General achievements and potential of Biotechnology, « Symposium in honor of the inauguration of the Jack Green Building of Biotechnology » - New Challenges and future prospects of biotechnology. (Jerusalem ; 25 mai 1994).

Ouverture et Présidence du Congrès : « Médecine et Philosophie », Sorbonne. (Paris ; 30 mai-4 juin 1994).

Conférence générale dans le cadre du Forum de la Société de Biochimie et de la Biologie Moléculaire. (Reims ; 7 juillet 1994).

Polyglutamylation of tubulin : general features and possible role as regulator of map binding, 10th ESN Meeting de l'European Society for Neurochemistry « The role of the cytoskeleton in nerve development » (Jerusalem ; 14-18 août 1994).

Organisation et Conclusions du « Colloque Uniqueness and universality in the Biological World », co-organisateur avec G. Bernardi (10-13 janvier 1995).

Progrès Scientifique et société : Le rôle médiateur des Académies, Colloque « Intellectual property in the Realm of Living forms and material » (Colloque de l'Académie des Sciences, Fondation Singer-Polignac) (Paris ; 26-27 janvier 1995).

Ouverture et Présidence du 7^e Congrès Européen de Biotechnologie, co-organisateur avec L. Pénasse (Nice ; 19-25 février 1995).

Colloque : « Aspects moléculaires et cellulaires de la neurogénèse » au Collège de France (Séminaires des chaires du Collège de France). Co-organisateur avec M^{me} Le Douarin (Paris ; 30-31 mars 1995).

Etude de la régulation génétique au cours de la différenciation musculaire à l'occasion de l'inauguration du Groupe d'Etudes et de Recherche sur le muscle et le nerf (Université de Créteil, mai 1995).

Invitation des Services Culturels et Scientifiques de l'Ambassade de France au Canada : « *Biologie : nouveaux espoirs, nouveaux défis, problèmes éthiques* » ; « *Developmental genetics and somatic differentiation of the muscle tissue* » (Ottawa ; 24 mai 1995).

M^{me} Y. BERWALD-NETTER a été invitée à présenter deux conférences : 1) *Glial and neuronal expression of the Na-G mRNA encoding a novel Na channel*. IBRO World Congress of Neuroscience (Kyoto, Japon ; juillet 1995) ; 2) *Na-G, a neuroglial sodium channel of the central and peripheral nervous system*. Glial Contributions to Behaviour (Newcastle, New Ireland ; août 1995).

M. Ph. DENOULET a participé au « 10th Meeting of the European Society for Neurochemistry » (Jerusalem, Israël ; août 1994), où il a été invité à donner une conférence : *Polyglutamylation of tubulin : general features and possible role as regulator of MAP binding*.

Il a également été invité à donner 3 conférences : 1) *Rôle de la polyglutamylation (et de la phosphorylation) dans la liaison des MAPs. Et tout ce qu'on ne sait pas...!*, Centre de Génétique Moléculaire (Gif-sur-Yvette, décembre 1994) ; 2) *Les moteurs protéiniques des microtubules : diversité structurale et fonctionnelle*, D.E.A. de Biochimie de Paris VI (Paris, février 1995) ; 3) *Polymorphisme de la tubuline neuronale et régulation de la liaison des MAP's*, dans le cadre des Séminaires des Cours des Professeurs N. Le Douarin et F. Gros, Collège de France (Paris, mars 1995).

M. J.C. LARCHER ET M. Ph. DENOULET ont participé au « 9th European Cytoskeleton Forum » à Dundee (Ecosse, U.K. ; septembre 1994) où ils ont présenté une communication « *Polyglutamylation of tubulin : role in the regulation of MAP binding* » (J.C. Larcher, D. Boucher, S. Audebert, B. Eddé et P. Denoulet).

M^{lle} C. REGNARD, M. B. EDDE ET M. Ph. DENOULET ont participé au « European Cell Biology Organization (ECBO) Meeting » à Heidelberg (Allemagne ; avril 1995) où ils ont présenté trois communications : 1) *Regulation of MAP binding by the length of the polyglutamyl chain of tubulin* (D. Boucher, J.C. Larcher, S. Lazereg, C. Regnard, B. Eddé et Ph. Denoulet) ; 2) *The in vivo structural stability of the centrosome* (Y. Bobonec, L. M. Mir, Ph. Denoulet, B. Eddé et M. Bornens) ; 3) *Cyclic polyglutamylation of the centrosome - microtubule network during the cell division cycle* (B. Eddé, M. Moudjou, Y. Bobonec, Ph. Denoulet et M. Bornens).

M^{me} M. LAZAR a été invitée à donner une conférence : *Transcriptional regulation of the mouse gene for muscle-specific enolase*. French-Russian Symposium on Regulation of Gene Expression, Novosibirsk (Russie ; juin 1995).

M^{me} M. LUCAS a présenté une communication affichée : *Differential expression of α and β enolase gene products in rat heart during development and hypertrophy* (A. Keller, N. Lamandé, J.D. Rouzeau, M. Lazar, J.L. Samuel, F. Marotte, C. Wisniewsky and K. Schwartz). International Workshop on Cardiac Growth and Regeneration (Viterbo, Italie ; juin 1994).

M^{me} A. KELLER a présenté deux communications : 1. *Regulation of tissue-specific expression of enolase isoforms* (N. Lamandé and M. Lucas) ; Cell Biol. Int. 18 (5), Tu-138, Fourth European Congress of Cell Biology, (Prague, République

Tchèque ; juin 1994) ; 2) *Differential expression of α and β enolase genes in skeletal and cardiac muscles, during development and at the adult stage* (M. Lucas, J.D. Rouzeau, N. Lamandé, M. Lazar, J.L. Samuel, F. Marotte, C. Wisnewsky and K. Schwartz) ; Abstract 09/6P, XXIII Colloque EMC, Ruhr Univ. of Bochum (Allemagne ; septembre 1994).

M^{me} M. KRIEGER a présenté deux communications affichées : 1) *Comparison of the aromatic L-amino acid decarboxylase from different classes of vertebrates* ; 2) *Characterization of rat aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) expressed in E.coli* au 17th Annual Meeting of the European Neuroscience Association (Vienne, Autriche ; septembre 1994).

M^{me} A.A. BATTAGLIA a présenté une communication affichée : *A confocal approach to the study of transient TH immunoreactive system in rat suprachiasmatic nucleus* au 17th Annual Meeting of the European Neuroscience Association (Vienne, Autriche ; septembre 1994).

M^{me} F. JEBAI a présenté une communication affichée : *Expression of an active rat aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) in E. coli* au 7th European Congress on Biotechnology (Nice ; 1995).

M. P. ROUGET a présenté deux communications : 1) *Regulatory genes involved in the control neural cell differentiation*, 10th Congress ISDN. (San Diego ; Juillet 1994). 2) *Identification of NPDC-1, a gene which controls neural cell proliferation*, 16th Congress IUBMB (Dehli ; septembre 1994).

GROUPE 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, N. BERESSI, A. BARRET,
R. PICART)

Les résultats que nous avons obtenus au cours de l'année écoulée s'inscrivent dans la continuité de nos recherches sur l'étude du transport intracellulaire de la prolactine et d'autres produits de sécrétion spécifiques des neurones et des cellules neuroendocrines, les granines.

1. *Etude de la biosynthèse, de la maturation post-traductionnelle et de la libération de la sécrétogranine II par les cellules à prolactine de rat*
(L. MULLER, C. TOUGARD)

Nous avons précédemment détecté des protéines de la famille des granines, la chromogranine B et la sécrétogranine II, dans tous les compartiments membranaires mis en jeu dans le processus sécrétoire, et en particulier dans les grains de sécrétion des cellules à prolactine (TOUGARD et al., 1989, OZAWA et al., 1994).

Ces protéines, qui contiennent de nombreux sites de clivage dibasiques, sont considérées comme des précurseurs potentiels de peptides biologiquement actifs. Laurent Muller a abordé l'étude de la maturation post-traductionnelle des granines par des expériences de « pulse-chase » et montré que des peptides, issus de clivages protéolytiques séquentiels des sécrétogranines, sont libérés dans le milieu de culture de cellules antéhypophysaires de rat en culture primaire et de cellules à prolactine de rat en lignée continue, les cellules GH3B6. Cette libération est stimulée par le TRH, neuropeptide sécrétagogue de la prolactine (MULLER et TOUGARD, 1995). Nous poursuivons actuellement nos investigations pour identifier, d'une manière fine, les compartiments subcellulaires mis en jeu dans cette maturation protéolytique.

2. *Recherche d'enzymes spécifiques susceptibles d'intervenir dans la maturation protéolytique des produits de sécrétion des cellules à prolactine*
(R. PICART, C. TOUGARD)

Cet axe de recherche a été abordé récemment dans notre groupe en collaboration avec le laboratoire du Professeur Paul COHEN (Paris). Nous avons ainsi

pu mettre en évidence dans les compartiments mis en jeu dans le processus sécrétoire de la prolactine, la présence d'une métalloendopeptidase sélective, la NRD convertase, et d'une aminopeptidase de type B. Les substrats spécifiques de ces enzymes dans la cellule à prolactine restent à déterminer.

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

(E. VILA-PORCILE)

Les cellules à prolactine de rat présentent une hétérogénéité morphologique associée à une hétérogénéité fonctionnelle. La distribution topographique des différents sous-types de cellules à prolactine dans le parenchyme antéhypophysaire n'est pas, pour l'instant, élucidée. Evelyne Vila-Porcile a poursuivi ses investigations dans ce domaine à l'aide d'une approche immuno-ultrastructurale et d'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 (VILA-PORCILE et al., 1994). Elle a ainsi recueilli des informations montrant que les cellules à prolactine de la zone externe et 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 de cellules à prolactine, identifiées sur des critères ultrastructuraux. Les cellules à petits grains de sécrétion (inférieurs à 200 nm) prédominent dans la zone interne, alors que les cellules à prolactine dites « classiques » à grains irréguliers (supérieurs à 400 nm) sont majoritaires dans la région périphérique. De plus, elle a pu montrer que les cellules à prolactine de la zone interne de l'adénohypophyse contenant des petits grains de sécrétion sont déjà actives au niveau basal et restent très stimulables, surtout par le TRH. Les cellules de la zone externe, de morphologie classique, peu nombreuses à sécréter en conditions basales, répondent à une stimulation plus par un recrutement de nouvelles cellules que par une augmentation de leur niveau de sécrétion individuel et sont très sensibles à la dépoliarisation par le KCl. Ces observations, tout à fait originales quant à leur implication physiologique, font l'objet d'un manuscrit qui est soumis à Cell.Tiss. Res.

4. *Recherche du rôle fonctionnel joué par les protéines G hétérotrimériques intracellulaires dans le trafic membranaire entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique*

(L. MULLER, A. BARRET, R. PICART, C. TOUGARD)

Dans le cadre de nos travaux sur la régulation du transport intracellulaire mis en jeu dans le processus sécrétoire, nous avons précédemment montré, en collaboration avec Vincent HOMBURGER dans le laboratoire de Joël BOCKAERT à Montpellier, la présence de protéines G hétérotrimériques, qui lient et hydroly-

sent le GTP, au niveau des compartiments membranaires intracellulaires des cellules à prolactine. Nous avons ainsi mis en évidence (MULLER et al., 1994) plusieurs sous-unités α 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.

Nous recherchons actuellement le rôle fonctionnel de ces protéines G hétérotrimériques dans le transport intracellulaire de la prolactine et des sécrétogranines entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Cette étude est abordée à l'aide d'agents interférant sur le cycle d'échange GDP-GTP et par des expériences de surexpression de certaines sous-unités de protéines G hétérotrimériques. De plus, un système de cellules perméabilisées d'une manière contrôlée par la streptolysine O a été mis au point par Alain BARRET. Ce système de transport *in vitro* s'avère être tout à fait fonctionnel. Il va nous permettre d'accéder au compartiment cytoplasmique, de faire entrer dans la cellule des agents stimulateurs ou inhibiteurs des protéines G intracellulaires et d'étudier ainsi spécifiquement leur effet sur le transport intracellulaire.

5. Collaborations au sein de l'Institut de Biologie du Collège de France

Des collaborations ont par ailleurs été développées au sein de l'Institut de Biologie du Collège de France : — avec le Groupe de M. LEVI-STRAUSS, dans le laboratoire du Professeur J. GLOWINSKI et concernant la recherche du rôle fonctionnel d'une protéine membranaire golgienne spécifique des neurones et des cellules neuroendocrines (SABERAN-DJONEIDI et al., 1995), — avec le Groupe de M. M. PORTIER dans le laboratoire du Professeur F. GROS et concernant la visualisation au microscope électronique de formations pathologiques du cytosquelette dans des fibroblastes humains, — et avec le Groupe de M.T. CHAUVET dans le laboratoire du Professeur P. CORVOL et concernant la visualisation immunocytochimique au microscope électronique du trafic intracellulaire de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

II. RÉGULATION NEUROENDOCRINE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DANS DES CELLULES MAMMOSOMATOTROPES

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

L'essentiel de nos recherches a concerné l'étude de deux types de facteurs potentiellement impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène de la prolactine dans des lignées clonales de cellules antéhypophysaires. Il s'agit, d'une part, de facteurs transcriptionnels rapidement inductibles (les proto-oncogènes

nucléaires codant pour des constituants du facteur transcriptionnel AP1) et d'autre part, de l'influence de la méthylation de l'ADN, une modification épigénétique susceptible d'altérer les mécanismes de transactivation. Nous avons également poursuivi l'étude de l'expression hypophysaire du TRH et de son précurseur. Les résultats recueillis par D. GROUSELLE, en collaboration avec les laboratoires de P. NICOLAS (Institut Jacques MONOD) et de F. PEILLON (INSERM Pitié-Salpêtrière), montrent que le précurseur est effectivement exprimé dans des lignées mammosomatotropes et somatotropes. Cependant, par rapport à l'hypothalamus et à l'hypophyse normale, il est peu ou non maturé. Néanmoins, cette maturation est modulable, en particulier par l'oestradiol-17 β qui l'accroît. Enfin, la collaboration relative à l'action antidopaminergique de l'amisulpride, établie avec les laboratoires Synthélabo-Delagrangue et impliquant M^{lle} Véronique TAVERNIER, a été poursuivie et conclue.

1. *c-fos* et *jun B*, des médiateurs potentiels de l'effet du TRH dans la lignée mammosomatotrope GH3B6

(E. PASSEGUÉ, G. BOULLA ET D. GOURDJI)

Un ensemble d'observations nous a précédemment suggéré que le facteur transcriptionnel AP1 (*c-Fos/Jun B*) pouvait être un médiateur des effets prolactiniques du TRH dans les cellules GH3B6 (PASSEGUÉ et al., 1994, 1995). Cependant, cette hypothèse était fondée presque exclusivement sur l'étude cinétique et pharmacologique de l'accumulation des transcrits de ces gènes d'expression précoce. Les résultats d'analyses portant sur des mécanismes situés en amont, au niveau transcriptionnel, et en aval, au niveau des oncoprotéines, viennent conforter plus avant cette hypothèse.

Tout d'abord, E. PASSEGUÉ a mis en évidence les mécanismes par lesquels le TRH module de manière biphasique le niveau des ARN messagers *c-fos* et *jun B* : le TRH active la transcription des deux gènes de manière également biphasique, mais diminue de moitié la demi-vie déjà très brève des transcrits néosynthétisés. La phase initiale d'induction transcriptionnelle est très puissante et culmine en 5 minutes ($\times 30$ - $\times 50$), puis décline rapidement. Cet effet, joint à la déstabilisation des transcrits, rend compte du pic d'accumulation des ARN messagers matures observés à 30 minutes. La deuxième phase de stimulation transcriptionnelle est de moindre amplitude, mais demeure encore détectable à 24 h, après un pic observé à 4h pour *jun B* et 8h pour *c-fos*.

La fonctionnalité des ARN induits a ensuite été appréciée par l'étude de la synthèse et des propriétés de liaison des oncoprotéines *c-Fos* et *Jun B*. Il en ressort que la stimulation précoce des transcrits *c-fos* et *jun B* par le TRH ne se traduit pas en une augmentation nette de l'accumulation de ces protéines. En revanche, la deuxième phase d'induction s'accompagne de la synthèse et de l'accumulation nucléaire des deux oncoprotéines. Cet effet est graduel, atteint son maximum 6 à 8 heures après le début du traitement et persiste, quoique atténué,

à 24 heures. Dans le même temps, le TRH augmente l'activité de liaison des protéines nucléaires au site AP1. Ces réponses précèdent, puis accompagnent la cinétique de l'induction du gène de la prolactine par le TRH. Or, des anticorps anti-c-Fos et anti-Jun B déplacent non seulement la liaison des nucléoprotéines au site AP1, mais aussi celle de complexes liés à une séquence oligonucléotidique du promoteur du gène de la prolactine, qui joue un rôle important dans sa régulation. Ceci précise notre hypothèse initiale suggérant que le facteur AP1 synthétisé lors de la deuxième phase d'induction des gènes *c-fos* et *jun B* par le TRH, pourrait être impliqué dans la transactivation du gène de la prolactine.

2. *L'expression du gène de la prolactine est inversement corrélée au degré de méthylation de sites précis du promoteur*

(J.N. LAVERRIÈRE, V. NGO, D. GOURDJI)

Les expériences résumées l'an passé démontraient sans ambiguïté que l'activité du promoteur PRL transfecté dans des cellules mammosomatotropes était réprimée par la méthylation globale du vecteur d'expression et que cette répression pouvait être mise en relation avec l'inhibition de la liaison de facteurs transcriptionnels (NGO et al., 1995). Les expériences réalisées cette année avaient pour but d'affiner ces observations et de les étendre à l'expression du gène endogène.

En ce qui concerne ce dernier point, l'une des approches réalisables était de rechercher l'existence d'une corrélation entre l'état de méthylation du promoteur endogène et le niveau d'expression *in vivo* dans différents modèles. Pour répondre à cette question, V. NGO et J.N. LAVERRIÈRE ont déterminé l'état de méthylation de quatre sites CG, localisés dans le promoteur proximal du gène de la prolactine, une séquence contenant les éléments de réponse à la majorité des facteurs assurant l'expression constitutive et régulée, dont Pit-1. L'étude a été réalisée selon la méthode de FROMMER et al. (1993, cf. rapport précédent), appliquée à de l'ADN extrait de trois lignées mammosomatotropes exprimant le gène de la prolactine à des degrés divers et de tissus normaux (antéhypophyse et foie). En bref, chaque échantillon d'ADN a été traité au bisulfite avant d'amplifier les séquences d'intérêt par PCR, puis de les cloner. Le séquençage génomique des brins sens et antisens de 30 à 50 clones par type d'ADN a révélé une corrélation inverse entre expression du gène endogène et méthylation des cytosines engagées dans des sites CG. Cependant, cette relation est limitée à des sites précis (3 sur 4) qui sont par ailleurs sensibles à la 5-azacytidine, un agent déméthylant. Une étude conduite en parallèle sur le promoteur du gène de l'hormone de croissance montre que le degré de méthylation de certains sites CG seulement (4 sur 9) est inversement corrélé au niveau d'expression, comme pour le promoteur du gène de la prolactine. En complément à cette étude, J.N. LAVERRIÈRE et V. NGO ont confirmé expérimentalement que la méthylation ciblée du promoteur PRL entier (2 kb) inhibe à la fois son efficacité constitutive et l'augmenta-

tion de l'activité transcriptionnelle induite par l'activation de mécanismes dépendant des protéines kinases A et C.

3. Effet anti-dopaminergique de l'amisulpride sur l'expression du gène de la prolactine

(V. TAVERNIER, E. PASSEGUÉ ET D. GOURDJI)

L'amisulpride est une benzamide largement utilisée en psychiatrie pour ses propriétés antidopaminergiques. De ses propriétés résultent aussi des hyperprolactinémies sévères que l'on observe également chez le rat. Mademoiselle TAVERNIER vient de montrer que cet effet implique une régulation de l'expression du gène de la prolactine. De plus, la confrontation des observations recueillies en culture et *in vivo* permet de penser que l'action hyperprolactinémisante de l'amisulpride résulte à la fois de ses effets antidopaminergiques centraux et antéhypophysaires (TAVERNIER et al., 1994). Ce travail a permis à M^{lle} Tavernier d'achever et de soutenir sa thèse d'Université.

PUBLICATIONS

MULLER L., PICART R., BARRET A., BOCKAERT J., HOMBURGER V. ET TOUGARD C. (1994). *Identification of multiple subunits of heterotrimeric G proteins on the membrane of secretory granules in rat prolactin anterior pituitary cells. (Molecular and Cellular Neurosci., 5, 556-566).*

VILA-PORCILE E. (1994). *Combination of electron microscopy and reverse hemolytic plaque assay for the study of pituitary prolactin cell heterogeneity. (Neuroprotocols: a Companion to Methods in Neurosciences, 5, 221-230).*

TAVERNIER V., THENOT J.P. ET GOURDJI D. (1994). *Effet anti-dopaminergique de l'énantiomère S(-) de l'amisulpride sur l'expression du gène de la prolactine par des cellules antéhypophysaires de rat en culture. (Ann. Endocrinol., 55, 43-44).*

PASSEGUÉ E., RICHARD J.L., BOULLA G. ET GOURDJI D. (1995). *Multiple intracellular signalings are involved in thyrotropin-releasing hormone (TRH)-induced c-fos and jun B mRNA levels in clonal prolactin cells. (Molecular and Cellular Endocrinol., 107, 29-40).*

NGO V., LAVERRIÈRE J.N. ET GOURDJI D. (1995). *CpG methylation represses the activity of the rat prolactin promoter in rat GH3 pituitary cell lines. (Mol. and Cell. Endocrinol., 108, 95-105).*

SABERAN-DJONEIDI D., MAREY-SEMPER I., PICART R., STUDLER J.M., TOUGARD C., GLOWINSKI J. ET LEVI-STRAUSS M. (1995). *A 19-kDa protein belonging to a new family is expressed in the Golgi apparatus of neural cells. (J. Biol. Chem., 270, 1888-1893).*

PASSEGUÉ E., LAVERRIÈRE J.N., BOULLA G. ET GOURDJI D. (1995). *La stimulation des proto-oncogènes c-fos et jun B : un relais potentiel des effets du TRH dans une lignée clonale de cellules à prolactine (GH3B6)*. (C.R. Soc. Biol., 189, 1-14).

TIXIER-VIDAL A., FAIVRE-BAUMAN A. ET GOURDJI D. *La thyroïdolibérine (TRH)*. (In « Neuropeptides et Neuromédiateurs », Coordinateur J. EPELBAUM. Editions INSERM. Sous presse)

MULLER L. ET TOUGARD C. « Production and secretion of N-terminal secretogranin II derived peptides in GH3B6 prolactin cells ». (*Mol. and Cell. Endocrinol.*, 112, 101 - 112).

CONGRÈS

Réunion Annuelle de la SOFTEC sur les voies de la transduction : de la membrane au noyau, Paris, 2 juin 1994, D. GOURDJI (Chairman).

13th International Congress of Electron Microscopy, Paris, 17-22 juillet 1994. C. TOUGARD, H. OZAWA, R. PICART ET E. VILA-PORCILE.

XXIII^e Congrès de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Sophia Antipolis, 31 août-2 septembre 1994. D. GOURDJI (Chairman), G. BOULLA, D. GOUSSELLE, J.N. LAVERRIÈRE, E. PASSEGUÉ et V. TAVERNIER.

25th Lunteren Lectures. Chromatin structure and the control of gene expression. Lunteren, The Netherlands, 20-23 septembre 1994. J.N. LAVERRIÈRE et V. NGO.

41^e Meeting of the European Tissue Culture Society, Vérone, 10-13 octobre 1994, D. GOURDJI.

Ecole Ultimatech, Giens, 17-21 octobre 1994, C. Tougard, (Conférencière invitée) et E. VILA-PORCILE.

Journée Claude Bernard sur les Facteurs de croissance (Société de Biologie), Paris, 3 novembre 1994. E. PASSEGUÉ, J.N. LAVERRIÈRE, G. BOULLA et D. GOURDJI.

Colloque de la Société de Biologie Cellulaire de France, Lyon, 8-10 mars 1995, L. MULLER.

ECBO Meeting, Heidelberg, 5-8 avril 1995, L. MULLER, C. TOUGARD et E. VILA-PORCILE.

SÉMINAIRES, ATELIERS

Séminaire à l'Unité INSERM 159, Centre Paul Broca, 75014 PARIS, 8 juin 1995, D. GOURDJI.

Journée de l'Institut de Biologie du Collège de France, Immortalisation Cellulaire, atelier co-organisé avec F. DE VITRY, 23 novembre 1994, D. GOURDJI.

Séminaire à l'Unité INSERM 293, Ecole Normale Supérieure, Montrouge, 17 janvier 1995, C. TOUGARD.

Séminaire à l'Unité INSERM 36, Collège de France, 20 janvier 1995, C. TOUGARD.

Atelier INSERM n° 70 sur les protéines G, Le Vésinet, avril 1995, L. MULLER.

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 à l'évaluation des xénobiotiques. 4 heures CM.

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

— Faculté de Médecine Lariboisière-St Louis, Université de Paris VII, Certificat (C2 et 3^e cycle) 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 deux étudiants, 4 heures.

— Université de Paris VI, Biologie Cellulaire et Moléculaire, 3^e cycle, CM + encadrement du séminaire bibliographique d'un étudiant, 3 heures.

DIPLOME

— Alain BARRET a obtenu le Diplôme d'Ingénieur du CNAM le 18 octobre 1994.