

## Biochimie cellulaire

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

Le cours cette année a porté sur les connaissances récemment acquises au sujet des mécanismes de la différenciation musculaire. En effet, le muscle squelettique a très largement servi de modèle d'études à l'analyse des processus de différenciation somatique, aux plans moléculaire et cellulaire. Il doit cet avantage à l'existence de nombreux types de lignées cellulaires myogéniques à développement continu capables de se différencier *in vitro*, à une connaissance très poussée de son embryogénèse et des gènes de régulation, à la richesse des facteurs épigénétiques impliqués (mécaniques, neuronaux, hormonaux) et enfin aux avancées spectaculaires dans l'étude des diverses pathologies qui s'y rattachent.

### Embryogénèse

Si, dans des cours précédents nous avons mis l'accent sur les stades les plus précoces de la formation des somites (groupements des cellules du feuillet mésodermique qui s'étagent sur l'axe antéro-postérieur de l'embryon et sont à l'origine des muscles, cartilages et formations osseuses), nous nous sommes plus particulièrement intéressé dans le présent cours, aux signaux intracellulaires qui influencent le destin des somites et leur conversion en muscles axiaux ou périphériques. Ainsi la notochorde, en émettant des signaux au niveau du tube neural, convertit la partie ventrale de celui-ci en une zone appelée « plancher » (floor plate) laquelle libère à son tour un facteur (Sonic Hedgehog, ou SHh) qui « ventralise » le somite, c'est-à-dire induit la différenciation de sa partie ventrale en sclérotome, précurseur du tissu cartilagineux. Le même couple « notochorde-tube neural » exerce également sur la partie dorso-médiane du somite, un effet inducteur qui convertit les cellules correspondantes en dermomyotome. Cet effet est lié à la libération du facteur wnt-1. Les cellules du dermomyotome ont alors deux destinées possibles : soit elles se convertissent en dermatome et en myotome ce dernier territoire recelant les premières cellules précurseurs des muscles axiaux (muscles du tronc) ; soit ces cellules, sous l'influence de la plaque latérale du

mésoderme intermédiaire (facteur BMP4) expriment le gène Pax3 qui bloque passagèrement leur différenciation myogénique, en inhibant l'expression des gènes régulateurs positifs de la famille MyoD. Ce « blocage » transitoire permet aux cellules du dermomyotome de migrer à l'extérieur, vers les bourgeons des membres, migration due à la réception en leur surface d'un signal émis par le mésenchyme de ces bourgeons : le facteur HGF (hepatocyte growth factor ou Scatter-factor) qui interagit avec le récepteur « c-met ».

Lors de leur migration, les cellules du dermomyotome échappent à l'influence régionale de la plaque latérale, cessent d'exprimer Pax3, et sont le siège d'une myogénèse terminale grâce aux effets des gènes de la famille MyoD. Ce schéma complexe a pu être corroboré par la caractérisation des facteurs diffusibles, ainsi que par des expériences de transplantation et d'hybridation *in situ*.

Le reste du cours a été consacré aux gènes de régulation myogéniques qui exercent un effet positif sur la différenciation musculaire (gènes de la famille MyoD) et aux protéines dont ils déterminent la synthèse.

### Gènes régulateurs myogéniques

Ayant rappelé l'historique de la découverte de ces gènes, lesquels sont au nombre de 4 (MyoD, myogénine, Myf5, MRF-4) nous avons particulièrement insisté sur la biologie moléculaire des facteurs correspondants. Ces facteurs myogéniques (ou « myogénisants ») agissent comme « trans-activateurs » des gènes à phénotype musculaire. Ils opèrent en s'attachant, à l'état d'hétérodimères, à des séquences cisrégulatrices appelées « boîtes E » (E-box) de formule générique : CANNTG (N étant quelconque). Le facteur non myogénique impliqué dans cette hétérodimérisation est une protéine de présence ubiquitaire, la protéine E12 (ou son isoforme E47), l'assemblage étant réalisé par appariements entre les régions  $\alpha$ -hélicales que contiennent les facteurs myogéniques et la protéine E12. Rappelons en effet que les facteurs myogéniques, issus des 4 gènes mentionnés ci-dessus présentent une organisation similaire comportant : une séquence d'acides aminés basiques (b) que prolongent deux  $\alpha$ -hélices (H1 et H2) séparées par une boucle flexible non hélicale (appelée L pour « Loop », en anglais). Le motif b-HLH est retrouvé dans un très grand nombre de facteurs de régulation. Il existe, comme l'ont démontré Davis *et al.*, il y a quelques années, dans la région basique, un code de reconnaissance ; entendons par là, certains acides aminés « clés » dont l'intégrité est essentielle, non pour l'attachement physique à la boîte E, mais pour l'activité myogénique de l'hétérodimère (activité mesurée par conversion de cellules mésodermiques, 3T3 10T1/2 en cellules musculaires). On sait en effet aujourd'hui qu'une fixation incorrecte, ou une conformation incorrecte d'un facteur MyoD lié à la boîte E ne permet pas une interaction normale avec les facteurs de stimulation adjuvants (SP<sub>1</sub>, SRF, MEF<sub>2</sub>, ... etc.). Des études cristallographiques récentes du complexe MyoD-ADN ont d'ailleurs montré que, lors de sa fixation à la boîte E, la séquence basique du facteur MyoD adopte une

conformation pseudo hélicale qui se loge donc le long de l'ADN en contiguïté directe avec l' $\alpha$ -hélice H1, ce qui peut expliquer les effets à distance qui sont liés à la séquence en acides aminés et à la conformation du domaine basique de MyoD, (ou des protéines régulatrices apparentées).

Des travaux récents ont permis d'éclaircir certaines questions pendantes ou certains paradoxes : il a été établi par exemple que la protéine E12 contient dans sa portion N-terminale, une séquence de 21 acides aminés qui l'empêche de former un homodimère par appariements entre régions  $\alpha$ -hélicales portées par deux chaînes polypeptidiques. Cette région inhibitrice est « déplacée » de son domaine d'action lors de l'interaction électrostatique très forte qui s'exerce entre certains acides aminés chargés, présents dans la séquence de l'hélice H1 de MyoD et des acides aminés de charge opposée contenus dans l'hélice H2 de E12, ce qui favorise l'hétérodimérisation MyoD-E12. De même, on pouvait s'interroger sur les raisons qui font que MyoD (ou les facteurs assimilés : myogénine, ... etc.) ne stimulent que les gènes à phénotype musculaire, alors que les motifs de séquences caractéristiques de la boîte E se retrouvent à proximité des promoteurs de divers autres gènes, par exemple dans les gènes des immunoglobines. L'effet activateur que l'on pourrait attendre au niveau de ces gènes non musculaires est empêché par des séquences d'ADN à effet inhibiteur, tel que  $\mu E5$ , absentes d'ailleurs des régions voisines des promoteurs de gènes musculaires.

Dans une dernière partie du cours nous avons discuté des aspects se rapportant au fonctionnement des gènes de la famille MyoD, et à leur rôle.

### **Contrôles et rôles respectifs des gènes de la famille MyoD**

Plusieurs expériences de transgénèse, mettant en œuvre des recombinants associant les régions « promotrices » des gènes régulateurs myogéniques, et des gènes « rapporteurs », ont permis de localiser les amplificateurs (enhancers) de ces gènes régulateurs. Celui du gène MyoD est très éloigné de la « TATA » box, tandis que, celui du gène myogénine en est très proche ; mais, d'une manière générale, il semble exister plusieurs amplificateurs dont certains sont sous la dépendance du facteur MEF<sub>2</sub>. Les rôles distinctifs des gènes de la famille MyoD ont été analysés en utilisant plusieurs voies d'approche. L'une d'elle a consisté à établir la chronologie d'expression de ces gènes au cours du développement myogénique (Buckingham *et al* ; Montarras et Pinset) par hybridation *in situ* sur des coupes de somites en différenciation *in vivo*, ou par la technique RT-PCR appliquée à des lignées myogéniques en cours de différenciation *in vitro*. On en a déduit que, chez la souris par exemple, Myf5 interviendrait à la phase initiale de la détermination ontogénique, MyoD ne s'exprimerait que dans des myoblastes déjà déterminés, myogénine étant le facteur « clé » contrôlant la différenciation terminale notamment la transition myoblaste  $\rightarrow$  myotube et MRF<sub>4</sub> n'intervenant qu'aux derniers stades. Il existe en outre des effets antagonistes entre Myf5 et MyoD. Ainsi l'expression de MyoD dans les myoblastes est elle généralement

contemporaine d'un arrêt dans l'expression de Myf5, et l'inhibition expérimentale du gène MyoD par des anti-sens conduit elle à une forte sur-expression de Myf5. Dans une autre approche on a eu recours à l'élimination élective de chacun des 4 gènes de la famille MyoD par la technique des recombinaisons homologues (Knock-out). Seule l'élimination du gène « myogénine » empêche l'apparition de tissu musculaire différencié chez l'embryon, sans inhiber d'ailleurs la formation des cellules myogéniques précurseurs. L'élimination du gène MyoD n'entrave pas la myogénèse *in vivo* ; elle s'accompagne d'une sur-expression de Myf5 et empêche la régénération des muscles à partir des cellules « satellites ». Celle de Myf5 ne fait que retarder la myogénèse et influe sur la formation des côtes. Il faut procéder à une double élimination des gènes MyoD et Myf5 pour assister à une disparition des cellules myogéniques ; l'élimination du gène MRF<sub>4</sub> ayant, quant à elle, peut d'effet notable.

Nous avons discuté à la fin du cours des facteurs susceptibles de moduler, positivement, l'activité des gènes régulateurs myogéniques eux-mêmes ! Un faisceau désormais convergent de données obtenues dans le laboratoire de Florini *et coll.* et dans le nôtre, permettent d'attribuer au facteur apparenté à l'insuline, le facteur IGFII, un rôle modulateur positif important. Son inhibition par expression d'un plasmide produisant un transcrit « anti-sens » empêche l'expression de MyoD (et d'ailleurs également celle du gène myogénine). Elle se traduit par un blocage de la différenciation myogénique que lève l'ajout, dans le milieu, d'IGFII ou d'insuline (qui agit sur le même récepteur). Fait remarquable, alors que le blocage du gène MyoD par un anti-sens empêche comme on pouvait s'y attendre la différenciation myogénique *in vitro*, il inhibe également de façon inattendue l'expression du gène IGFII. Il existe donc une boucle de régulation positive réciproque entre ces deux gènes et il est vraisemblable que le niveau d'expression du gène IGFII contribue à maintenir le niveau d'expression de MyoD à un niveau suffisant pour que puissent se dérouler normalement les premiers stades de la myogénèse.

F.G.

#### SÉMINAIRES

Les séminaires ont porté sur divers aspects du cours et ont notamment permis d'aborder les données récentes relatives aux myopathies et aux tentatives de Thérapie génique.

Les conférenciers et les titres de leurs exposés étaient les suivants :

M. FARDEAU (INSERM U153, Paris) : *Dystrophies des ceintures : Histoire et développement actuels.*

A. KAHN (ICGM, U129, Paris) : *Thérapie génique des affections neuromusculaires.*

D. MONTARRAS et C. PINSET (Laboratoire du Développement cellulaire, Institut Pasteur, Paris) : *Rôle des facteurs de la famille MyoD, et des facteurs insulino-minétique dans le contrôle de la myogénèse.*

K. SCHERRER (Institut Jacques Monod, Paris) : *Cylocalisation différentielle des prosomes spécifiques sur le cytosquelette de myoblastes et dans la structure sarcomérique du muscle et leur rôle éventuel dans la myogénèse.*

M. LAZAR (Biochimie Cellulaire, Collège de France, Paris) : *Régulation de l'expression du gène de l'énolase spécifique des muscles striés.*

D'autres invités ont donné un séminaire :

M.S. BÉTINA (Cancer Research Institute, Bratislava, Slovaquie) : *Genetic control of the major mitochondrial ADP/ATP carrier in Saccharomyces cerevisiae.*

P. SÉBILLON (Centre de Génétique Moléculaire ; Gif-sur-Yvette) : *Analyse d'une mutation T → G dans le gène de la β-globine humaine : relation avec l'épissage.*

#### ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

*Na-G, un nouveau canal sodique neuro-gliale : structure du promoteur et régulation de l'expression du gène.*

(Y. BERWALD-NETTER, M. ESCURAT, S. GAUTRON, C. GRUSZCZYNSKI, E. HOUZET-AMIGOU, A. KOULAKOFF, B. LESAFFRE, E. POIRAUD).

Dans notre rapport précédent, nous avons fait état de la structure et la distribution cellulaire des ARNm Na-G. Il s'agit de messagers codant une nouvelle forme de canal sodique neuro-gliale présent dans les neurones et la glie du système nerveux périphériques (sensoriel, sympathique et parasympathique) mais limité à des sous-populations cellulaires de régions bien circonscrites du cerveau. Son expression intéresse principalement les neurones relais de noyaux du thalamus dorsal, connus pour leur importance dans le traitement et la transmission des informations sensorielles. Les cellules des organes circumventriculaires, apparentées à la glie, e.g. tancytes de l'émicence médiane et pituicytes de la neurohypophyse, l'expriment également. De manière inattendue, *in vivo*, les ARNm Na-G ne sont pas décelables dans la glie centrale.

Cette distribution sélective des messagers Na-G dans le tissu nerveux a suggéré que des éléments régulateurs au niveau du gène, mais aussi des facteurs épigénétiques, pourraient contribuer à restreindre son expression à certains types cellulaires.

Aussi avons-nous examiné la répercussion sur le taux des ARNm Na-G de traitements par divers facteurs biologiques, hormones et agents modulateurs de seconds messagers. La dexaméthasone entraîne une hausse reproductible de la teneur en ARNm Na-G dans les astrocytes et les cellules de Schwann en culture,

indiquant une régulation transcriptionnelle positive par les corticostéroïdes. Par contre, leur taux est drastiquement diminué, suite au traitement des astrocytes par des agents qui provoquent une accumulation d'AMPC intracellulaire mais aussi par le facteur GGF (Glial Growth Factor), appartenant à la famille des neuréglines. Ces résultats ont suggéré une régulation négative de l'expression du gène Na-G dans les astrocytes par des interactions neuro-gliales. Cette hypothèse fut confirmée dans des expériences impliquant des lésions ciblées de neurones par injection stéréotaxique d'acide kaïnique : les neurones éliminés, on observe l'induction des messagers Na-G dans l'astroglie des aires cérébrales lésées.

Contrairement aux astrocytes, la glie périphérique (cellules de Schwann) exprime les transcrits Na-G tant *in vivo* qu'en culture où leur taux est augmenté à la fois sous l'effet de l'accumulation d'AMPC intracellulaire et du GGF.

Les ARNm Na-G sont transcrits à partir d'un promoteur unique dépourvu d'une boîte TATA ; ils sont initiés de manière hétérogène à partir d'un petit groupe de sites dont deux sont utilisés préférentiellement. Des expériences de Southern blot réalisées avec plusieurs sondes suggèrent l'existence de deux à quatre gènes homologues. Ainsi, comme c'est le cas pour d'autres canaux ioniques, neuronaux ou musculaires, Na-G appartient à une sous-famille multigénique.

La région génomique comprenant le promoteur Na-G a été isolée et sa séquence analysée. Plusieurs sites potentiels de liaison pour des facteurs transcriptionnels connus, dont *tst-1/scip/Oct6* et REST, ont été identifiés. Ce dernier, exprimé dans les cellules non-neuronales, agit comme répresseur de plusieurs gènes neuronaux. Depuis peu nous avons entrepris l'examen de l'activité du promoteur par transgénèse en utilisant des constructions hybrides comportant des fragments génomiques en amont du site d'initiation, couplés au gène reporteur Lac-Z. L'analyse de la première lignée de souris transgéniques indique que les premières 1 050 bases du promoteur Na-G contiennent les éléments requis pour l'activité transcriptionnelle dans le système nerveux central et notamment dans les noyaux du thalamus. Des expériences de « foot-printing *in vivo* » ont été entreprises pour identifier les régions génomiques impliquées dans les interactions ADN-protéines-nucléaires spécifiques d'un type cellulaire donné. Ensemble, ces approches devraient permettre d'identifier les éléments impliqués dans le contrôle de la spécificité cellulaire et la modulation de l'expression du gène Na-G.

Par ailleurs, nous avons produit des anticorps contre des protéines de fusion correspondant à des régions de la séquence Na-G, sélectionnées en raison de leur forte divergence par rapport aux autres isoformes connues de canaux sodiques. Ces anticorps ont été purifiés par affinité. Ils reconnaissent la protéine traduite *in vitro* à partir des ARN transcrits de l'ADNc Na-G cloné. Actuellement, ces anticorps sont utilisés pour localiser la protéine Na-G dans des coupes de tissu nerveux. Ultérieurement, ils serviront pour la caractérisation biochimique et immunochimique de la protéine.

*Expression, structure et fonctions des protéines microtubulaires.*

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

*1. Étude des interactions entre tubulines et moteurs moléculaires. Régulation par la polyglutamylation.*

Nous avons précédemment montré que la chaîne polyglutamylée de la tubuline est impliquée dans la régulation des interactions entre la tubuline et les protéines associées (MAPs) structurales, comme Tau ou MAP2, en modulant ces interactions à la manière d'un « potentiomètre moléculaire ». 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.

Nous avons utilisé des domaines recombinants de kinésine, correspondants aux têtes ATPasiques du domaine moteur (en collaboration avec E. & E.-M. Mandelkow, Max Planck Institute, Hamburg, Allemagne), dans des expériences d'interaction sur membrane. Nous avons montré que la polyglutamylation contrôle la liaison de ces MAPs motrices sur la tubuline, de la même façon que pour les MAPs structurales.

En utilisant des domaines moteurs de kinésine conventionnelle de rat (moteur antérograde se déplaçant vers l'extrémité « plus » du microtubule) et de kinésine apparentée de drosophile (*ncd*, moteur rétrograde de la division cellulaire, se déplaçant vers l'extrémité « moins » du microtubule), nous avons montré que le vecteur directionnel d'un moteur ne repose pas simplement sur sa liaison spécifique avec une sous-unité  $\alpha$  ou  $\beta$ -tubuline donnée.

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. En utilisant une batterie d'anticorps anti-tubuline pour masquer différents épitopes, tous localisés dans le domaine C-terminal, nous avons montré que les sites de liaison des MAPs structurales et motrices sont adjacents et localisés sur la face interne d'une hélice  $\alpha$ . Cette localisation particulière permet d'expliquer pourquoi les MAPs ne peuvent se lier à la tubuline quand la structure globale du domaine C-terminal est fermée et pourquoi l'accessibilité de ces sites augmente lorsque la polyglutamylation ouvre ce domaine.

*2. Étude 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 600 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)

La famille de gènes et d'isozymes de l'énolase représente un modèle favorable à l'analyse des aspects moléculaires de la différenciation terminale des tissus nerveux et musculaire. Nous avons cette année plus particulièrement développé l'étude de l'isoforme  $\beta\beta$  spécifique des muscles striés, dans la perspective de mieux comprendre la signification physiologique de l'existence d'isoénolases distinctes dans les neurones et dans les myofibres striées matures. On sait en effet que les cinq isoénolases ( $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ ,  $\gamma\gamma$ ,  $\alpha\beta$  et  $\alpha\gamma$ ) identifiées dans les tissus des Vertébrés Supérieurs ont des propriétés catalytiques identiques. De plus, les séquences en acides aminés des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  présentent plus de 80 % d'homologie. Toutefois il existe, à côté de régions très conservées, de courtes régions variables, spécifiques de chaque sous-unité. Ces régions spécifiques, selon les modèles de structure tridimensionnelle de l'énolase, sont localisées à la surface du dimère. On peut donc faire l'hypothèse que les isoénolases diffèrent essentiellement par leurs propriétés d'interaction avec d'autres protéines cellulaires (protéines du cytoquelette, protéines membranaires ou d'un complexe multienzymatique), permettant ainsi d'ajuster la localisation subcellulaire de l'activité enzymatique émolase aux besoins physiologiques spécifiques de la cellule. Dans le cas de la cellule musculaire, il y aurait ainsi une production localisée plus efficace de l'ATP nécessaire à la contraction.



Nous avons abordé cette question dans le tissu musculaire strié, par des méthodes biochimiques et de biologie cellulaire. L'énolase  $\beta\beta$  a été purifiée à partir de muscles squelettiques de Souris. L'étude de l'interaction de cette isoénolase avec d'autres protéines importantes pour le métabolisme énergétique de la cellule musculaire a permis de montrer que l'énolase  $\beta\beta$  lie avec une haute affinité les enzymes adjacentes dans sa voie métabolique, phosphoglycérate mutase et pyruvate kinase, en accord avec l'hypothèse que ces trois enzymes forment ensemble un segment glycolytique fonctionnel. De plus, la sous-unité  $\beta$  émolase présente une microhétérogénéité qui apparaît au cours de la différenciation myogénique *in vivo* et *in vitro*. Nous avons maintenant entrepris l'analyse de l'origine de cette microhétérogénéité, probablement due à des modifications post-traductionnelles, et l'étude de son rôle dans la modulation de l'interaction avec d'autres protéines musculaires et dans la localisation subcellulaire de la sous-unité  $\beta$  de l'énolase.

L'obtention de la protéine pure  $\beta\beta$  a également permis d'obtenir des antisera de haut titre et très spécifique de la sous-unité  $\beta$ , indispensables à l'analyse de la localisation cellulaire et subcellulaire de cette sous-unité. Les premières analyses montrent une distribution striée de l'immunoréactivité  $\beta$  dans les myofibres rapides du muscle squelettique adulte, dont l'analyse fine va être maintenant entreprise par microscopie confocale.

#### *Étude des décarboxylases d'acides aminés conduisant à des neuromédiateurs*

(J. THIBAUT, A.A. BATTAGLIA, G. BRUNEAU, C. DOUBININE, L. GABERNET, F. JEBAI, M. KRIEGER, S. ZERARKA)

##### *1. Étude de la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) au cours de l'embryogénèse.*

Nous avons entrepris l'étude de l'expression de l'AADC au cours du développement embryonnaire du stade E12 au stade E15 par hybridation *in situ* de sondes ARN anti-sens. Trois types de sondes ont été utilisés : 2 sondes de 70 bp correspondant respectivement à l'extrémité 5' non codante du messenger de type « neuro » et « non neuro » spécifique et une sonde correspondant à la partie codante du messenger. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la spécificité tissulaire présente au stade E15 n'existe pas au stade E12, stade auquel les 2 messagers « neuro » et « non neuro » spécifiques s'expriment indifféremment dans toutes les structures susceptibles de contenir de l'AADC. Nous avons pu noter également la localisation du messenger de type non neuro spécifique dans les méninges et la paroi des vaisseaux au stade E15.

##### *2. Étude de la structure de la protéine AADC*

Dans le but d'étudier les rapports structure/fonction de la protéine, nous avons exprimé l'AADC chez *E. Coli*. Deux systèmes ont été étudiés en parallèle :

l'expression de l'AADC sous forme d'une protéine de fusion Maltose Binding Protein (MBP)-AADC et sous forme d'une protéine recombinante dans les vecteurs d'expression pET3a et pET20b+. Bien que dans les 2 cas nous ayons pu produire chez *E. Coli* une protéine possédant la fonction de décarboxylation, les caractéristiques enzymatiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) se sont révélées optimales dans le 2<sup>e</sup> système. Sur la base d'une étude informatique de type « Hydrophobic Cluster Analysis » (HCA) nous avons pu cibler des expériences de mutagenèse dirigée sur quelques résidus qui se sont révélés essentiels pour l'activité de l'enzyme.

### 3. *Étude de la régulation de l'expression de l'AADC*

Une régulation de l'expression de l'enzyme a été mise en évidence au niveau de la rétine sous l'effet de la lumière. Nous avons développé une étude, sur ce thème dans l'épiphyse de mouton. Nous avons pu montrer une augmentation de l'activité spécifique de l'AADC le jour par rapport à la nuit. Le neuro-transmetteur mis en jeu dans cette stimulation n'a pu encore être identifié, en effet la section du rameau issu du ganglion cervical supérieur qui innerve la glande pinéale ne semble pas entraîner de variations notables dans l'activité de l'AADC.

### 4. *Étude de la régulation de l'expression de l'AADC : choix des promoteurs*

Les séquences situées en amont et en aval des promoteurs de type neuro et non neuro spécifiques ayant été clonés, des expériences de transfection de cellules d'origine neuro ectodermique : le phéochromocytome et d'origine mésodermique ont été effectuées. En utilisant la luciférase comme gène reporter nous avons pu montrer que chaque promoteur était activé par des facteurs spécifiques pour chaque tissu.

### 5. *Localisation chromosomique de l'histidine décarboxylase : Travail effectué en collaboration avec M.G. Mattei et G. Bruneau.*

En utilisant un élément de l'ADNc de l'histidine décarboxylase (HDC) le gène a pu être localisé sur le chromosome 15 humain en position q15-q21 et sur le chromosome 2 de la souris en E5-G. Malgré la similitude des symptômes observés dans le syndrome de Prader Willi qui pouvaient être liés à une déficience en HDC, les 2 gènes sont trop éloignés sur le chromosome 15 pour pouvoir interférer.

### 6. *Dosage de l'ARNm de l'histidine décarboxylase en collaboration avec P. Conti (Italie) et G. Bruneau (Tours)*

Par la technique de Northern blot nous avons pu mesurer les variations de quantités d'ARNm dans des mastocytes normaux de péritoine de rat sous l'influence d'un agent chimiotactique : le MCPI. Ce facteur provoque l'agrégation des mastocytes, il stimule la synthèse de l'ARNm de l'HDC pour des concentrations de 25 à 100 nanomolaires.

*Étude des mécanismes moléculaires contrôlant la prolifération et la différenciation des cellules nerveuses et précurseurs.*

(P. ROUGET, Y. ABRAHAM, I. BORDE, A. DO THI, E. DUPONT, C. EVRARD, I. SANSAL)

Nous avons poursuivi notre travail concernant la recherche de gènes régulateurs intervenant dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Parallèlement, nous avons entrepris l'étude du mécanisme d'action de la protéine NPDC-1 (pour Neural Proliferation Differentiation Control-1), codée par l'un des gènes régulateurs que nous avons identifié.

Le gène *npdc-1* est exprimé spécifiquement dans les cellules neuronales et gliales en arrêt de division. Il code pour une protéine comportant deux domaines apparentés à des séquences de type « Hélice-Loop-Hélice », un signal de localisation nucléaire, un domaine de liaison aux membranes comparable à celui de SREBP (Sterol Responsive Element Binding Protein) et deux régions phosphorylables incluant plusieurs sites consensus pour les MAP-kinases.

Des expériences de transfection stable de vecteurs d'expression pour NPDC-1, dans des lignées cellulaires transformées qui ne l'expriment pas de manière endogène, nous ont montré que NPDC-1 régule négativement la prolifération cellulaire et supprime la transformation. La réversion de l'effet de NPDC-1 à l'aide d'oligonucléotides anti-sens a confirmé que ces régulations résultent bien de l'action de NPDC-1.

La construction de vecteurs procaryotes nous a conduit à l'obtention d'une protéine de fusion entre NPDC-1 et la Glutathion-S-Transférase (GST). Nous avons ainsi produit la protéine de manière préparative et obtenu des anticorps anti-NPDC-1. Ces anticorps ont permis d'observer que la protéine synthétisée à faible niveau à subconfluence reste dans le cytoplasme, alors qu'après confluence, elle semble associée en partie à la membrane nucléaire, en partie au noyau.

D'autre part, les protéines de fusion GST-NPDC-1 permettent d'immobiliser NPDC-1 sur microbilles de Glutathion-sépharose. A l'aide de ces protéines immobilisées, nous avons commencé à identifier des protéines interagissant sur NPDC-1. Ce travail a déjà mis en évidence l'interaction de NPDC-1 d'une part avec la cycline D1, d'autre part avec le facteur de transcription E2F1, la cycline A et la kinase cdk2.

Des vecteurs eucaryotes « inductibles », sens et anti-sens, sont en cours de construction. Afin d'examiner plus précisément le mode d'action de NPDC-1, ils seront transférés d'une part dans des lignées cellulaires immortalisées ou transformées, d'autre part dans la lignée germinale de la souris.

Après clonage du gène *npdc-1* complet nous avons entrepris de déterminer la localisation chromosomique du gène, en collaboration avec Bernard Dutrillaux. Jusqu'à présent, nous avons observé que ce gène est situé dans la région f du chromosome 6 de la souris, qui correspond à la région p11-p12 du chromosome 12

humain, région pour laquelle des modifications ont été décrites dans le cas de plusieurs gliomes.

Maintenant que nous avons isolé les séquences génomiques pourvues de régions flanquantes suffisamment longues (2kb en 5' et 6kb en 3'), nous abordons l'étude de la fonction de NPDC-1 par recombinaison homologue (knock-out du gène associé à un marquage lacZ ; mutagénèse dirigée et substitution de séquences).

#### PUBLICATIONS

1995

BATTAGLIA A.A., BELTRAMO M., THIBAUT J., KRIEGER M., CALAS A. (1995). A confocal approach to the morphofunctional characterization of the transient tyrosine hydroxylase system in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 696, 7-14.

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. *NeuroReport*, 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.

CONTI P., BOUCHER W., LETOURNEAU R., FELICIANI C., REALE M., BARBACANE R.C., VLAGOPOULOS P., BRUNEAU G., THIBAUT J., THEOARIDES (1995). Monocyte chemotactic protein-1 provokes mast cell aggregation and (<sup>3</sup>H) release. *Immunology* 86, 434-440.

GALIANA E., VERNIER P., DUPONT E., EVRARD C., 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.

GAYRARD V., THIERY J.C., THIBAUT J., TILLET Y. (1995). Efferent projections from the retinohiasmatic area to the median eminence and to the part nervosa of the hypophysis with special reference to the A15 dopaminergic cell group in the sheep. *Cell Tissue Res.* 281, 561-567.

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  $\alpha$  and  $\beta$  enolase genes during rat heart development and hypertrophy. *Amer J Physiol* 269, (Heart Circ Phy. 38) H1843-H1851.

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.*, 41, 306-313.

LE BERT 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*, 1, 619-628. \* The first two authors contributed equally to this work.

REGNARD C. (1995). Chromatographie en phase liquide. *Biofutur*, 149, 1-22.

1996

COSSON J., WHITE D., HUITOREL P., EDDÉ B., CIBERT C., AUDEBERT S., GAGNON C. (1996). Inhibition of flagellar beat frequency by a new anti- $\beta$  tubulin antibody. *Cell Motil. Cytoskel.* (sous presse).

DECHESNE C.J., KELLER A. (1996). Differential  $\alpha$  enolase immunoreactivity in the two neuron types of the rat spiral ganglion during postnatal development. Comparison with neurofilament protein immunoreactivity. *Auditory Neuroscience*, 2, 33-46.

DELOULME J.C., LUCAS M., GABER C., BOUILLON P., KELLER A., ECLANCHER F., SENSENBRENNER M. (1996). Expression of neuron specific enolase gene by rat oligodendroglial cells during their differentiation. *J. Neurochem.*, 66 :3, 936-945.

GAGNON C., WHITE D., COSSON J., HUITOREL P., EDDÉ B., DESBRUYÈRES E., PATURLE-LAFANECHÈRE L., MULTIGNER L., JOB D., CIBERT C. (1996). The polyglutamylated lateral chain of  $\alpha$ -tubulin plays a key role in flagellar motility. *J. Cell Sci.*, 109:6, 1545-1553.

LARCHER J.-C., BOUCHER D., LAZEREG S., GROS F., DENOULET P. (1996). Interaction of kinesin motor domains with  $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin subunits at a Tau-independent binding site : regulation by polyglutamylation. *J. Biol. Chem.* (sous presse).

MALZAC P., MATTEI M.G., THIBAUT J., BRUNEAU G. (1996). Chromosomal localization of the human and mouse histidine decarboxylase genes by in situ hybridization. Exclusion of the HDC gene from the Prader-Willi syndrome region. *Hum. genet.* 97, 359-361.

REGNARD C., AUDEBERT S., BOUCHER D., LARCHER J.-C., EDDÉ B., DENOULET P. (1996). Les microtubules : polymorphismes fonctionnels de la tubuline et des protéines associées (MAP's structurales et motrices). *C. R. Soc. Biol.*, 190, 1-14.

WAREMBOURG M., DENEUX D., KRIEGER M. (1996). Progesterone receptor immunoreactivity in aromatic l-amino acid decarboxylase-containing neurons of the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *J. of comparative Neurology*, 367, 477-490.

#### DIPLÔMES D'ÉTUDES APPROFONDIES

H. AYADI, « Clonage des séquences génomiques de NPDC-1 et construction de vecteurs pour l'étude de sa fonction et de sa régulation ». Septembre 1995.

S. ZERARKA, « *Étude de la régulation de l'expression de l'AADC dans l'épiphyse de mouton* ». Septembre 1996.

L. GABERNET, « *La décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) : Étude, par hybridation in situ, de l'expression d'un messenger neuronal et non neuronal, au cours du développement chez le rat* ». Juin 1996.

#### CONFÉRENCES, INVITATIONS, PARTICIPATION A DES CONGRÈS

A l'occasion du 20<sup>e</sup> anniversaire de la découverte de l'ADNc s'est tenu à l'Université de Genève un important Colloque au cours duquel le Professeur François GROS a fait une conférence intitulée « Aspects moléculaires et cellulaires de la myogénèse ».

En Novembre 1995, a eu lieu, à l'Institut Weizmann des Sciences, le traditionnel Colloque Pasteur-Weizmann intitulé « La régulation cellulaire du développement – aspects normaux et pathologiques ». Le Professeur François GROS y a également donné une conférence sur un sujet similaire.

En Mai 1996, il a été invité à prononcer une conférence en Israël, lors du Symposium organisé à l'occasion du 80<sup>e</sup> anniversaire du prof. E. Katzir, ancien chef d'État et biophysicien de réputation internationale sur le thème « Différenciation somatique – le modèle musculaire ».

Également en Mai 1996, le consulat Général de France au Québec et l'Association des Étudiants Canadiens Français (ACFAS) l'ont invité au 4<sup>e</sup> Congrès de l'ACFAS à l'Université Mc Gill, où il a prononcé la conférence d'ouverture de la section biomédicale, conférence intitulée « De la double hélice à la Thérapie génique ».

M<sup>me</sup> Y. BERWALD-NETTER a présenté trois conférences : 1) *Les isoformes des canaux sodiques voltage-sensibles de neurones et de cellules gliales : propriétés et régulation de l'expression*. Minicolloque INSERM « Interactions neurones-glies » (Chantilly, France ; octobre 1995). 2) *The saga of a neuro-glial sodium channel*, au Symposium « Biological Regulation » en l'honneur de François Gros (Les Pensières, France ; juin 1996). 3) *Na-G a novel neuro-glial Na channel*. Département de Neurobiologie de l'institut Weizmann (Rehovot, Israël ; juin 1996).

Elle a donné un séminaire sur invitation du prof. O. Pongs : *Primary structure, cell-type specificity and expression of a novel neuro-glial Na channel*. Laboratoire de Biologie Moléculaire, Université de Hambourg (Allemagne ; septembre 1995).

Elle a également présenté une communication : *Glial and neuronal expression of the Na-G mRNA encoding a novel Na channel*. 4th IBRO World Congress of Neurosciences. (Kyoto, Japon ; juillet 1995).

M. Ph DENOULET a participé au « 4<sup>e</sup> Colloque de la SOFTEC » (Palais du Sénat, Paris ; mai 1996) où il a été invité à donner une conférence : *Diversités fonction-*

nelles des tubulines et des MAPs dans la cellule nerveuse. Il a organisé une Séance de la Société de Biologie : « Le cytosquelette neuronal : aspects structuraux et fonctionnels » (Hôpital Ste-Anne, Paris ; février 1996) où il a donné une conférence : *Microtubules et protéines associées : MAP's structurales et motrices*. Il a également donné une conférence : *Les moteurs moléculaires des microtubules : diversité structurale et fonctionnelle*, dans le cadre du DEA de Biochimie de Paris VI (février 1996). Enfin, il a participé avec Bernard Eddé au Symposium « Biological Regulation » en l'honneur de François Gros (Les Pensières, France ; juin 1996) où il a donné une conférence : *The tubulin saga : a necessary diversity*.

M<sup>lle</sup> C. JABET a présenté une communication affichée : *Transcriptional regulation of the mouse gene encoding muscle-specific enolase*. (S. Brosset, N. Lamandé, J.D. Rouzeau, F. Gros and M. Lazar) XXIV European Muscle Conference. Abstract p. 37. (Firenze, Italie ; septembre 1995).

M<sup>me</sup> A. KELLER a été invitée à donner un séminaire : *L'isoforme musculaire de l'énolase : études au cours du développement et chez l'adulte*. Université Paris XI, URA 1131, CNRS (Paris ; janvier 1996).

Elle a également présenté deux communications affichées : 1) *The muscle-specific isoform of the glycolytic enzyme enolase : purification from mouse hind-limb muscles and biochemical characterization*. (T. Merkulova, F. Gros and M. Lazar) XXIV European Muscle Conference. Abstract p. 91 (Firenze, Italie ; septembre 1995). 2) *The muscle specific isoforms of enolase*. (T. Merkulova, F. Gros and M. Lazar) In EMBO workshop on Myogenesis and Molecular Genetics of Neuromuscular diseases. Abstracts p. 43 (Ein-Gedi, Israel ; février-mars 1996).

M<sup>me</sup> M. LAZAR a été invitée à donner deux séminaires : 1) *Régulation de l'expression du gène de l'énolase  $\beta$ , marqueur du programme de différenciation myogénique*. Club des Neurosciences, CHU Henri Mondor (Créteil ; janvier 1996) ; 2) *The enolase gene family : a model for developmental control of nerve and muscle cell differentiation*. Symposium « Biological Regulation » en l'honneur de François Gros (Les Pensières, France ; juin 1996).

M. P. ROUGET a été invité à donner une conférence : *NPDC-1 regulates cell proliferation and differentiation and is able to act as a tumor suppressor gene*. 15th Meeting of the International Society for Neurochemistry (Kyoto ; juillet 1995).