

Communications cellulaires

M. Jean-Pierre CHANGEUX, professeur

L'année dernière, les principes généraux du développement synaptique avaient été exposés sur l'exemple type de la jonction nerf moteur - muscle strié. Il en était ressorti que plusieurs catégories de signaux chimiques diffusibles interviennent dans la régulation de ce développement. Le propos du cours de cette année a été d'étudier, d'une manière plus générale, les facteurs chimiques de la différenciation et de la croissance de la cellule nerveuse.

Le neurone, comme toute cellule de l'organisme, possède noyau, mitochondries, reticulum endoplasmique et corps de Golgi ; il s'en distingue par la présence de prolongements ramifiés ou neurites : axone et dendrites. Le volume des neurites peut être beaucoup plus important que celui du corps cellulaire proprement dit ou soma. C'est ainsi que dans le cas de la cellule de Purkinje du cervelet, le volume de l'axone peut atteindre $238\,000\ \mu\text{m}^3$, celui des dendrites $30\,500\ \mu\text{m}^3$ alors que celui du soma n'est que de $16\,000\ \mu\text{m}^3$. L'arbre dendritique de la cellule de Purkinje reçoit de l'ordre de 80 000 contacts synaptiques. D'une manière générale, chaque neurone du système nerveux central reçoit et établit plusieurs milliers, voire plusieurs dizaines de milliers de synapses réalisant un réseau connectionnel d'une extrême complexité.

Dans quelle mesure un réseau aussi complexe est-il « reproductible » : par rapport au plan de symétrie d'un même individu et d'un individu à l'autre ? Une des causes principales de la variabilité des organismes vivants est l'hétérogénéité du matériel génétique au sein des populations naturelles. Pour l'éliminer, Levinthal et ses collaborateurs se sont tournés vers des individus génétiquement homogènes obtenus par reproduction parthénogénétique : un poisson tropical, *Poecilia formosa*, et un crustacé, la puce d'eau, *Daphnia magna*. Chez *P. formosa*, les nerfs optiques croisent complètement. Ce croisement peut évidemment avoir lieu de deux manières différentes. Sur 100 animaux examinés, les fibres droites passent sur les gauches dans 66 cas, les droites sur les gauches pour le reste. Une variabilité existe donc à ce niveau bien qu'une disposition prédomine sur l'autre. L'œil et le ganglion optique de *D. magna* ont été débités en coupes sériées, observées en microscopie.

pie électronique, et l'arborisation axonale des cellules réceptrices reconstituée à partir de plusieurs individus. Œil et ganglion optique comportent un nombre fixe de cellules et chaque neurone peut être ainsi étiqueté. Pour un même neurone, une variabilité dans la topologie de l'arborisation axonale existe entre la droite et la gauche mais elle est moins importante que celle que l'on observe d'un individu à l'autre. La variabilité porte sur le nombre absolu de synapses, le schéma connectionnel est maintenu. Chez des individus génétiquement homogènes, une fluctuation intrinsèque de l'organisation synaptique est présente mais est de caractère plus quantitatif que qualitatif.

Sur le plan biochimique, un neurone particulier ne synthétise et ne libère qu'un seul neuro-transmetteur (règle de Dale). Plusieurs exceptions notables ont été rapportées par Hokfelt dans le cas où l'un des neuro-transmetteurs est un peptide. Par contre, en règle générale, un neurone donné porte à sa surface une mosaïque de récepteurs pour des neuro-transmetteurs différents. Le phénomène d'hypersensibilité de dénervation, classique dans le cas du muscle squelettique, a aussi été démontré dans le cas du neurone avec les neurones parasympathiques du septum du cœur de grenouille (Kuffler).

*

**

La ségrégation des cellules ectoblastiques à partir desquelles se différencie l'ébauche nerveuse est très précoce. Dans l'embryon de poulet, à la 20^e heure, le tube neural est formé. La mise en place des corps neuroniques du système nerveux central de l'adulte à partir des neuroblastes du tube neural s'effectue à la suite d'étapes de prolifération et de mort cellulaire, de migration et de différenciation (en particulier du type de neuro-transmetteur); finalement, a lieu la poussée des neurites. Une idée simple, mais peut-être naïve, est que les neuro-transmetteurs, qui, chez l'adulte, servent de signaux dans la transmission synaptique agissent aussi comme facteurs de régulation et de différenciation embryonnaire.

Dès la fin du XIX^e siècle, il était reconnu que l'environnement ionique de l'embryon affecte son développement. Par exemple, le lithium (8×10^{-2} M) ajouté à l'eau de mer provoque une anomalie de la gastrulation de l'embryon d'oursin. L'endoderme prend une taille excessive et s'évagine. C'est le phénomène de l'exogastrulation. Le sulfocyanure de sodium a l'effet opposé. Lorsque l'on traite des jeunes gastrulas de triton ou d'axolotl par le lithium, la corde disparaît puis, pour des actions fortes, le cerveau et les annexes sensorielles. *In vitro*, une ébauche d'épiderme de gastrula de grenouille exposée aux ions Li^+ , Na^+ ou Ca^{++} produit des cellules nerveuses. La balance ionique agit d'une manière critique sur la différenciation précoce des cellules nerveuses. Or, les neuro-transmetteurs sont connus pour régler cette balance ionique; sont-ils eux-mêmes des signaux de différenciation embryonnaire ?

1) les neuro-transmetteurs acétylcholine, épinéphrine, norépinéphrine, dopamine et surtout sérotonine sont détectés dans les embryons d'oursin à des stades très précoces : la concentration de sérotonine, en particulier, est du même ordre de grandeur que celle du tissu nerveux de l'adulte (Buznikov).

2) des agents pharmacologiques, neuro-transmetteurs ou composés connus pour modifier leur métabolisme ou leur action affectent les étapes précoces du développement de l'œuf d'oursin : clivage et/ou gastrulation. La sérotonine et ses dérivés sont particulièrement actifs dans ce sens.

3) des récepteurs pharmacologiques pour divers neuro-transmetteurs existent dans la membrane de l'œuf de Xénope. L'acétylcholine provoque la dépolarisation (suivie de désensibilisation) de l'œuf de Xénope ; cet effet n'est pas bloqué par le curare mais par l'atropine. Dans les mêmes conditions, la sérotonine, la dopamine et l'adrénaline provoquent une hyperpolarisation (Miledi).

L'injection de nicotine (agoniste du récepteur cholinergique nicotinique), dans le sac vitellin d'embryons de poulet entre le 2^e et le 4^e jour d'incubation provoque un raccourcissement et une torsion de la région cervicale de l'embryon (Landauer). Le premier signe de l'effet de la nicotine est une torsion de la corde qui prend un aspect méandrique puis le tube neural prend le même aspect sinueux, enfin les vertèbres se télescopent. L'allongement anormal de la corde est dû à l'augmentation du nombre de divisions cellulaires. En présence de nicotine le nombre total des cellules passe de 873 à 1 044 (Strudel). L'effet de la nicotine est bloqué par la d-tubocurarine et la toxine α de *Naja*. Il met donc en jeu un récepteur nicotinique semblable à celui de la jonction neuromusculaire (Strudel). Les méthodes histochimiques et les dosages biochimiques révèlent la présence de catécholamines dans la corde. Les agonistes cholinergiques, dont la nicotine, provoquent un accroissement de leur synthèse. De plus, les antagonistes du récepteur β -adrénergique (propranolol par exemple) protègent contre l'effet de la nicotine. Sans aucun doute les neuro-transmetteurs acétylcholine et catécholamines interviennent comme signaux de la régulation. Un schéma possible, mais qui reste à démontrer, est que l'acétylcholine libérée par le tube neural provoque la synthèse et la libération de catécholamines par les cellules de la corde ; une fois libérées, les catécholamines stimuleraient la prolifération de ces mêmes cellules.

Un effet éventuel des catécholamines sur la prolifération cellulaire dans le cerveau du rat a été suggéré par Balasz et ses collaborateurs. La réserpine (qui provoque la libération de catécholamines et de sérotonine) injectée chez le rat nouveau-né provoque une diminution de l'incorporation de thymidine dans l'ADN qui n'est pas simplement due à une sous-alimentation des rats. La phase G₁ du cycle de division cellulaire semble préférentiellement allongée.

Ces expériences ne permettent pas de démontrer si le neuro-transmetteur agit *directement* sur la division cellulaire ou par l'intermédiaire de relais hormonaux. Enfin, ce sont principalement les cellules gliales qui, dans le cerveau, se divisent après la naissance et seraient affectées par la réserpine.

*

**

Un des traits les plus manifestes de la différenciation du neurone est le type de neuro-transmetteur qu'il synthétise. Les dérivés de la crête neurale constituent un matériel de choix pour caractériser les facteurs de cette différenciation élémentaire. Suivant la région de l'embryon, les cellules de la crête neurale peuvent donner des neurones parasymphatiques *cholinergiques* (Somites 1-7, Somite 28 et suivant) ou orthosymphatiques *adrénergiques* (Somites 7-28). Les cellules chromaffines de la médullosurrénale dérivent de la crête neurale située entre les Somites 18 et 24. Une même cellule de la crête neurale peut-elle, indifféremment, donner naissance à un neurone adrénergique ou cholinergique? Afin de répondre à cette question, Nicole Le Douarin et ses collaborateurs ont tiré profit des différences de structure existant entre les noyaux des cellules somatiques de caille et de poulet. Des cellules de caille transplantées dans l'embryon de poulet (et réciproquement) peuvent être facilement repérées. C'est ainsi que, par transplantation hétérotypique (de caille à poulet) et hétérotopique (d'une région à l'autre de l'embryon) on démontre que des cellules de la crête neurale qui, dans les conditions normales, donnent naissance à des neurones cholinergiques peuvent, après transplantation, produire des neurones adrénergiques et réciproquement). La détermination du type de transmetteur a lieu *après* la migration des neuroblastes.

P. Patterson et ses collaborateurs ont mis au point une méthode de culture *in vitro* de neurones sympathiques (ganglion cervical supérieur) qui a conduit à la mise en évidence d'un facteur diffusible responsable de la détermination adrénergique ou cholinergique. Différentes conditions de culture permettent d'obtenir des neurones purs ou mélangés à des cellules satellites (gliales en particulier). Ces neurones purs synthétisent des catécholamines mais pas d'acétylcholine. Ils synthétisent par contre de l'acétylcholine s'ils sont cultivés en présence de cellules gliales. Le milieu de culture de cellules non neuronales ajouté à une culture de cellules neuronales provoque l'apparition du caractère cholinergique et la disparition concomitante du caractère adrénergique. Spontanément, les neuroblastes sympathiques acquièrent le caractère adrénergique; les cellules gliales secrètent un facteur diffusible qui les oriente vers une différenciation cholinergique. Ce facteur a été purifié 350 fois à partir du milieu de culture de cellules cardiaques de rat. C'est une protéine basique de masse moléculaire supérieure à 50 000 daltons.

Fait remarquable, la « réceptivité » des neuroblastes en culture au facteur cholinergique est fonction du potentiel de membrane. La dépolarisation des

neuroblastes en culture par les ions K^+ (20 mM) diminue 70 fois le taux de synthèse d'ACh, de même qu'un autre agent dépolarisant la vératridine, ou même la stimulation électrique. Il semble que la dépolarisation du neurone provoque l'entrée de Ca^{++} qui sert de signal interne réglant l'expression du caractère cholinergique induite par le facteur présent dans le milieu conditionné.

La transition de l'état adrénérique à l'état cholinergique se fait de façon brutale. On peut toutefois saisir des neurones dans un état où ils synthétisent les deux transmetteurs à la fois (Furshpan). Ces neurones forment des synapses avec eux-mêmes (autapses), bloquées par l'hexamethonium (donc cholinergique) et avec des myocytes en culture, bloquées par le propranolol (donc adrénérique). Il s'agit vraisemblablement de neurones en train de passer de l'état cholinergique à l'état adrénérique.

*

**

En 1948, Bueker, un étudiant de V. Hamburger, constate qu'une tumeur du sarcome 180 implantée dans la paroi d'embryon de poulet de 3 jours devient innervée par des fibres issues d'un ganglion sensoriel adjacent qui, lui-même, s'hypertrophie. Cette observation reprise par Rita Levi-Montalcini et V. Hamburger allait conduire à la mise en évidence d'un facteur diffusible, émis par la tumeur, et responsable de la croissance des fibres nerveuses. Une des étapes essentielles de l'identification de ce facteur, ou « nerve growth factor » (NGF) fut la mise au point d'un test *in vitro*. Un ganglion sympathique (ou sensoriel) est mis en culture en milieu nutritif. Après 12 heures en présence de NGF un halo de fibres nerveuses se forme autour du ganglion et son diamètre peut être pris comme une mesure de la quantité de NGF présent. Le NGF a été purifié par Stanley Cohen à partir de venin de serpent puis de glande sous-maxillaire de souris mâle. C'est une protéine de coefficient de sédimentation 2,5 S et masse moléculaire 26 500. Elle est constituée par l'assemblage de deux chaînes identiques de 118 acides aminés dont la séquence est connue (NH² terminal sérine, COOH terminal arginine). Le dimère est la forme active du NGF mais le monomère, après pontage covalent sur des granules de Sépharose semble lui aussi avoir une activité biologique. La chaîne du NGF présente des analogies de structure remarquables avec la pro-insuline.

Dans la glande sous-maxillaire le dimère (β NGF) se trouve associé à deux autres types de protéine : 2 sous-unités α (masse moléculaire 26 500) et deux sous-unités γ (masse moléculaire 26 000) (Shooter). La sous-unité γ est un enzyme qui ressemble à la trypsine et qui pourrait intervenir dans la maturation par coupure protéolytique d'un précurseur du NGF ou pro-NGF (masse moléculaire de la chaîne 22 000). Le rôle de la sous-unité α est inconnu.

Le récepteur du NGF a pu être mis en évidence sur des neurones sensoriels d'embryon de poulet à l'aide d'un dérivé iodé du NGF qui a conservé toute son activité biologique. Les constantes cinétiques d'association et de dissociation ainsi que la constante de dissociation à l'équilibre ($2.6 \times 10^{-10}M$) du NGF pour son récepteur sont très voisines de celle de l'insuline pour son récepteur. Le récepteur du NGF n'est présent que sur les deux cibles privilégiées du NGF : les neurones des ganglions sensoriels et sympathiques. Il est aussi beaucoup plus abondant sur les neurones d'embryon jeune (8-14 jours) que d'embryon âgé (16-21 jours).

Les premières observations de R. Levi-Montalcini sur le rat nouveau-né ont montré que l'injection de NGF provoque un accroissement de volume du ganglion cervical supérieur d'un facteur 3,5, d'un accroissement de diamètre des neurones d'un facteur 1,3 et d'une accélération de la différenciation de ces mêmes neurones. Deux hypothèses pouvaient rendre compte de l'accroissement de volume observé : 1) une stimulation de la division des neuroblastes, 2) une stabilisation des somas neuroniques les protégeant contre la mort neuronale. Plusieurs artifices accélèrent la mort spontanée des neurones immatures : l'injection de sérum anti-NGF (immunosympathectomie), de 6-hydroxydopamine (poison spécifique des terminaisons adrénergiques), de vinblastine (alcaloïde de la Pervenche qui désorganise les microtubules) ou la section des axones. Dans tous les cas, NGF protège contre cette accélération provoquée de la mort neuronale. Dans les conditions normales, le nombre total de neurones du ganglion cervical supérieur passe, chez le rat, de 21 000, à la naissance, à 13 000, 90 jours après celle-ci. L'injection néonatale de NGF prévient cette mort spontanée. Toutefois, cet effet n'est pas suffisant pour expliquer l'augmentation du volume du ganglion : celui-ci est dû à une augmentation spectaculaire (6 fois) du nombre des cellules *non* neuronales.

L'effet de l'axotomie sur la mort neuronale peut s'expliquer sur la base d'un transport rétrograde de NGF de la cible vers le soma. En injectant du NGF marqué dans l'œil on montre effectivement un transport de celui-ci jusqu'au ganglion cervical supérieur à une vitesse de 2,5 mm à l'heure ! Le transport rétrograde est conditionné par la présence de sites de haute affinité sur les terminaisons nerveuses. Par exemple, la peroxydase du raifort n'est pas transportée sauf si elle est couplée au NGF. Une endocytose suit la liaison et le transport se poursuit dans les citernes du réticulum endoplasmique lisse.

Une fois arrivé au niveau du soma, le NGF provoque une accélération de plusieurs processus métaboliques (utilisation du glucose, pompage des acides aminés...) mais le blocage de la transcription par l'actinomycine D n'interfère pas avec l'effet du NGF sur la croissance des neurites. Le NGF n'affecte pas le contenu total du ganglion en tubuline mais stimule l'assemblage de la tubuline en microtubules.

Le NGF agit aussi comme « inducteur » des enzymes de synthèse des catécholamines. Cet effet est bloqué par la cycloheximide mais *pas* par l'actinomycine. Le NGF aurait un effet régulateur sur la transcription de RNA messagers préexistants.

Enfin, il pourrait être aussi un facteur de chimiotactisme des terminaisons nerveuses en croissance. Son injection dans les ventricules cérébraux chez la souris nouveau-né provoque l'invasion de l'encéphale par des fibres adrénergiques issues du ganglion sympathique. *In vitro*, les fibres nerveuses sympathiques croissent d'une manière *directionnelle* vers un compartiment (Campenot) ou un organe cible (Burnstock) contenant du NGF.

*
**

Depuis le XIX^e siècle on sait que la carence en iode et par là en hormone thyroïdienne (la thyroxine est tétraiodée) entraîne des altérations du psychisme (apathie, défaut de mémoire) dont les symptômes (« crétinisme ») sont d'autant plus graves que l'insuffisance thyroïdienne est précoce. Le traitement par la thyroxine reverse ces effets avec d'autant plus d'efficacité que le traitement est précoce. L'hormone thyroïdienne peut donc être rangée parmi les facteurs chimiques de la croissance et de la différenciation du système nerveux.

Un modèle animal de la maladie humaine a été mis au point par Eayrs chez le rat. Il provoque l'hypothyroïdie, par ablation chirurgicale ou bien par injection d'iode 131 ou de thiouracile chez la ratte gestante puis allaitante, le produit passant dans le lait de la mère. L'hypothyroïdie provoque une chute de poids de l'animal. Toute étude sur l'hypothyroïdie doit donc inclure comme contrôle des animaux dénutris. Les rats hypothyroïdiens ont des performances nettement réduites dans divers tests neurologiques et d'apprentissage (labyrinthe). L'hyperthyroïdie augmente ces performances mais ne fait pas apparaître de fonctions nouvelles.

L'analyse électrophysiologique du cortex cérébral de rats hypothyroïdiens de 15 jours révèle une diminution de la fréquence et de l'amplitude des ondes de l'électroencéphalogramme ainsi qu'une abolition des réponses évoquées par exemple par stimulation lumineuse.

L'étude anatomique ne montre pas de diminution significative du nombre total de cellules dans le cortex cérébral mais une réduction majeure de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux du cortex imprégnés à l'argent par la méthode de Golgi. L'effet est particulièrement spectaculaire au niveau des cellules de Purkinje du cervelet dont l'arborisation devient en quelque sorte « rachitique » (Legrand). L'hypothyroïdie s'accompagne aussi d'un retard, vraisemblablement secondaire, de la myélinisation. L'effet majeur de l'hypothyroïdie est donc un déficit significatif de la connectivité cérébrale qui suffit à expliquer le crétinisme.

Les recherches très récentes de Nunez et de ses collaborateurs éclairent d'un jour nouveau l'effet de l'hormone thyroïdienne sur la poussée des neurites au cours du développement cérébral. Les microtubules constituent le squelette de base des prolongements nerveux. Ils résultent de l'assemblage en tubule creux de 13 filaments de tubuline. La tubuline elle-même est un dimère de chaînes polypeptidiques différentes α et β (masses moléculaires respectives 55 000 et 53 000). A froid, ou en présence de colchicine les microtubules se dépolymérisent en tubuline et sa réassociation en tubules peut être suivie aisément par absorption de la lumière. Il a été montré par divers auteurs (Weingarten, Nunez, Lockwood) que la vitesse et le rendement de la polymérisation de la tubuline étaient réglés par une autre protéine, τ ou TAP, de masse moléculaire 6 700. Cette protéine est incorporée dans les microtubules à raison d'environ 1 τ pour 10 tubulines ($\alpha\beta$). Au cours du développement cérébral, le contenu du cerveau de rat en tubuline s'accroît puis, après le 15^e jour, *décroit* avant de se stabiliser. Un raton de 3 jours a environ le même contenu en tubuline par masse de tissu frais, qu'un rat de 15 jours. Par contre, la tubuline du rat de 3 jours polymérise très mal par rapport à celle du rat de 15 jours. L'addition de τ à la tubuline du rat de 3 jours provoque sa polymérisation. Il semble donc être le facteur limitant de la polymérisation de la tubuline et donc de la formation des neurites au cours du développement. Fait remarquable, le rat hypothyroïdien de 15 jours possède une tubuline cérébrale qui polymérise aussi mal que celle du rat de 3 jours et répond comme celle-ci à l'addition de τ . Un mécanisme plausible de l'action de l'hormone thyroïdienne sur le développement cérébral est la régulation de la synthèse du facteur de polymérisation τ . On ne sait toutefois pas si cet effet est direct ou indirect (par exemple par le truchement du NGF).

*
**

Le dernier chapitre du cours a porté sur un sujet délicat, celui de la sexualisation du cerveau. Des différences anatomiques manifestes existent entre le cerveau du mâle et de la femelle chez les vertébrés supérieurs, l'homme en particulier. Après normalisation, le cerveau de la femme pèserait environ 100 g de moins que celui de l'homme (Pearl). Cette différence ne semble pas due à un changement du rapport cellules gliales - neurones, mais reflète une différence intrinsèque du nombre total de neurones (Ellis). Des différences comportementales significatives existent aussi entre garçons et filles. En mesurant l'angle formé par la cuisse et la jambe, on constate que les filles sont en général plus hyperextensibles que les garçons, donc présentent un tonus musculaire moins élevé. La force d'étreinte de la main dominante est toujours supérieure chez les garçons et le mécanisme d'attachement par contact physique plus positif chez les garçons que chez les filles. Les filles sont supérieures aux garçons pour quelques aptitudes linguistiques, mais cette différence s'estompe avec l'âge tandis que les tâches impliquant

la perception de relations spatiales sont effectuées avec plus de succès par les garçons et pour la durée de leur vie. L'hypothèse a été proposée que cette différence était due à une moindre spécialisation des hémisphères cérébraux chez la femme que chez l'homme.

Chez le rat, la femelle réceptive présente une posture particulière arquée qui facilite une intromission possible par le mâle. Ce réflexe de lordose peut être quantifié. La femelle ovariectomisée perd ce comportement qui se rétablit par injection d'oestradiol et de progestérone. La castration du rat mâle nouveau-né provoque l'apparition ultérieure du réflexe de lordose, mais la même opération chez l'adulte n'a pas cet effet. L'injection de testotérone chez la femelle nouveau-né prévient l'apparition du réflexe de lordose. Ces hormones sexuelles agissent donc de deux manières différentes : 1) en « activant » des circuits préexistants, 2) en provoquant la mise en place de circuits différents. La substance réticulée mésencéphalique et l'aire préoptique de l'hypothalamus sont des cibles cérébrales des hormones sexuelles. Chez le rat, le cycle oestral est sous la commande de neurones présents en particulier dans l'aire préoptique qui libèrent par leurs terminaisons l'hormone de libération (LHRH) de l'hormone lutéinisante (LH). La libération pulsatile de LHRH n'existe pas chez le mâle. Des différences dans l'organisation fonctionnelle des neurones de l'aire préoptique ont été signalées entre mâle et femelle : 1) nombre de projections de l'amygdale, 2) topologie de l'arborisation dendritique, 3) nombre de contacts synaptiques après section de la *stria terminalis* (Raisman). Enfin, le volume du noyau préoptique médian lui-même est huit fois plus grand chez le mâle que chez la femelle. Des données biochimiques, enfin, confirment les résultats de l'anatomie. La distribution du récepteur de l'oestradiol dans les parties antérieures moyennes et postérieures de l'aire préoptique est différente chez le mâle et chez la femelle et n'est soumise à des variations cycliques que chez la femelle.

Les hormones sexuelles peuvent donc être rangées parmi les facteurs qui déterminent la différenciation de la cellule nerveuse.

J.-P. C.

SÉMINAIRES

Les maladies du muscle squelettique et de son innervation

M. Michel FARDEAU : *Les affections neuro-musculaires humaines d'origine génétique. Historique, classification, méthodologie des études histopathologiques. Atrophies myopathiques et neuropathiques.*

M. Michel FARDEAU : *Les affections neuromusculaires humaines d'origine périphérique au cours d'affections humaines d'origine génétique connue ou supposée (Sclérose latérale amyotrophique, maladie de Werdnig-Hoffmann, neuropathies périphériques, amyotrophies Charcot-Marie).*

M. Michel FARDEAU : *Les dystrophies musculaires progressives : la myopathie de Duchenne, la myopathie facio-scapulo-humérale de Landouzy-Dejerine, les myopathies dites « des ceintures » et les myopathies distales. Différentes hypothèses physiopathologiques (microcirculatoire, nerveuse, membranaire, etc.).*

M. Michel FARDEAU : *Les « myopathies congénitales ». Anomalies du développement normal de la fibre musculaire squelettique.*

M. Michel FARDEAU : *Les myopathies oculaires. Différents aspects cliniques, génétiques et morphologiques. Le problème des myopathies avec anomalies mitochondriales majeures.*

M. Stéphane METRAL : *Les paralysies périodiques avec dyskaliémie ; pathologie des flux ioniques transmembranaires.*

M. Michel FARDEAU : *La dystrophie myotonique de Steinert. Les différentes myotonies congénitales. Les anomalies membranaires responsables de la réaction myotonique.*

M. Jean-Claude DREYFUS : *Les glycogénoses musculaires.*

M. Jean Edouard DESMETS : *La myasthénie d'Erb-Goldflam et les différents syndromes myasthéniques.*

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE COMMUNICATIONS CELLULAIRES

L'activité scientifique du laboratoire pendant l'année 1977 a porté sur deux thèmes principaux : les propriétés fonctionnelles de la protéine réceptrice de l'acétylcholine de l'organe électrique de Torpille et le développement synaptique étudié sur le cervelet de la souris et de quelques-uns de ses mutants neuropathologiques ainsi que sur la jonction neuromusculaire de l'embryon de poulet.

A) PROTEINE RECEPTRICE DE L'ACETHYLCHOLINE :

1) *Modèle du « Régulateur cholinergique » (Heidmann et Changeux 1978, Heidmann et Changeux, en préparation).*

Les principaux résultats obtenus au cours des derniers mois et années ont été regroupés dans le cadre d'un modèle théorique qui apparaît comme un

compromis entre le modèle phénoménologique de Katz et Thesleff pour les effets *in vivo* d'activation et de désensibilisation par l'acétylcholine et le modèle moléculaire de Monod, Wyman et Changeux pour les transitions conformationnelles des enzymes allostériques. L'unité fonctionnelle élémentaire engagée dans la régulation de la perméabilité cationique par l'acétylcholine, le « régulateur cholinergique » est supposé résulter de l'association de deux protéines distinctes : le « récepteur cholinergique » *sensu stricto*, qui porte le site de liaison de l'acétylcholine et « l'ionophore », responsable de la translocation sélective de cations et sur lequel se lient anesthésiques locaux et histrionicotoxine. Le régulateur cholinergique est ensuite postulé exister sous au moins trois états conformationnels discrets, en équilibre réversible, qui préexistent à la liaison de ligands et correspondent à des états de perméabilité et des états d'affinité différents pour les ligands cholinergiques et pour les anesthésiques locaux. Dans l'état de repos, l'ionophore serait fermé et l'affinité pour les antagonistes élevée; dans l'état désensibilisé, l'ionophore serait également fermé et l'affinité pour les agonistes et les anesthésiques locaux la plus élevée, enfin, dans l'état actif l'ionophore serait ouvert et les affinités pour les agonistes cholinergiques et les anesthésiques locaux intermédiaires entre celles de l'état de repos et celles de l'état désensibilisé. La stabilisation par les ligands cholinergiques des états pour lesquels ils possèdent une affinité préférentielle rend compte des processus d'activation, de désensibilisation et de l'effet des anesthésiques locaux sur ces deux processus. Une description mathématique simplifiée du modèle ainsi que des cinétiques d'interconversion entre états préexistants a été établie.

2) Structure du régulateur cholinergique

L'amélioration de la méthode de purification (Sobel *et al* 1977) de fragments de membranes riches en récepteur cholinergique à partir de l'organe électrique de Torpille (confection du gradient de saccharose, organes prélevés sur des animaux de petite taille, sélection des fractions d'activité spécifique élevée) conduit à des fractions très enrichies dont la composition en chaîne polypeptidique paraît particulièrement simple (Sobel *et al* 1978). L'électrophorèse unidimensionnelle en présence de dodécylsulfate de sodium révèle, après coloration par le bleu de Coomassie, seulement deux bandes de masse moléculaire apparente 40 000 et 43 000 respectivement et d'intensité voisine. Les bandes de masses moléculaires apparentes 50 000, 66 000 et 100 000 daltons observées par divers auteurs et par nous-mêmes avec des préparations d'activité spécifique moindre sont présentes à l'état de trace dans les fractions très purifiées. Après traitement des membranes par le dithiothreitol, agent réducteur des ponts disulfure, seule la bande de masse moléculaire apparente 40 000 réagit avec le 4(N-maleimido)-phenyl-³H triméthyl-ammonium (³H MPTA), marqueur d'affinité du site récepteur développé par Karlin. Dans les mêmes conditions, la bande de masse moléculaire apparente 43 000 se marque très sélectivement avec l'acide iodacétique C¹⁴. Il apparaît donc

clairement que les fragments de membrane très riches en récepteur et qui contiennent l'ionophore puisqu'ils sont excitables *in vitro*, ne sont composés que par deux unités protéiques distinctes.

La dissolution de ces fragments de membrane par un mélange de deux détergents non ioniques (Triton X-100 et bérol) en présence d'inhibiteur de protéase fait passer en solution une protéine de coefficient de sédimentation 9S qui lie la toxine α de *Naja*. Il s'agit de la protéine réceptrice sous une forme non dénaturée. Après purification additionnelle par centrifugation, l'électrophorèse en gel dénaturant ne révèle qu'une bande principale de masse moléculaire apparente 40 000 qui est marquée par le MPTA. La protéine réceptrice *sensu stricto*, contrairement à ce qui est généralement admis, ne paraît donc constituée que par un seul élément protéique. Ceci se trouve confirmé par l'analyse des acides aminés N-terminaux qui ne révèle que la sérine. La protéine réceptrice serait donc un oligomère de la chaîne de masse moléculaire apparente 40 000.

Lors de la purification de la protéine réceptrice par centrifugation à partir de l'extrait brut de fragments de membrane s'isole une protéine qui s'accumule au fond du tube. Remise en suspension, cette protéine très agrégée ne donne qu'une seule bande de masse moléculaire apparente 43 000 par électrophorèse dénaturante. Cette fraction protéique, appelée protéine 43-K, a une composition moyenne en acides aminés différente de celle de la protéine réceptrice purifiée. Afin de comprendre la fonction de la protéine 43-K, des études de spectroscopie de fluorescence ont été entreprises avec les fragments de membrane de départ, la protéine réceptrice purifiée et la protéine 43-K.

L'histrionicotoxine (HTX) est une toxine purifiée à partir de la peau de la grenouille équatoriale *Dendrobates histrionicus* (Albuquerque *et al* 1973) qui, *in vivo*, bloque le fonctionnement de l'ionophore cholinergique et, *in vitro*, agit comme un effecteur allostérique du site récepteur dans son état membranaire (Kato et Changeux 1976). Elle possède, de plus, des propriétés de fluorescence qui n'interfèrent pas avec celles de la quinacrine. Avec les fragments de membrane riches en récepteur équilibrés avec la quinacrine la carbamylcholine provoque un accroissement d'intensité de fluorescence qui est reversé par l'HTX avec un Kapp voisin de 0,7 μ M. Deux anesthésiques locaux, quotane et prilocaïne, abolissent l'effet de l'HTX. Le signal de fluorescence de la quinacrine sensible à l'HTX est donc directement en relation avec le site de liaison des anesthésiques locaux.

Les mêmes études effectuées sur la protéine réceptrice et sur la protéine 43-K donnent des résultats entièrement différents : d'abord aucun effet de la carbamylcholine sur la fluorescence de la quinacrine, ensuite, aucun effet de l'HTX sur celle-ci en présence de protéine réceptrice purifiée mais un effet significatif de l'HTX sur la protéine 43-K équilibrée avec la quinacrine

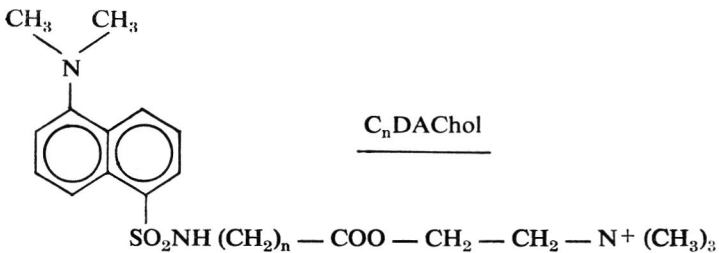
avec un Kapp voisin de celui observé avec les fragments de membrane. Les résultats obtenus ne sont pas dus à la présence de détergent qui est soigneusement éliminé des fractions purifiées. En conclusion, il apparaît clairement que la protéine 43-K purifiée lie quinacrine et HTX suivant des modalités qui ressemblent beaucoup à celles observées avec les fragments de membrane intacts. Comme les expériences *in vivo* indiquent que quinacrine et HTX bloquent la translocation des ions au niveau de l'ionophore cholinergique, il apparaît comme très vraisemblable, bien que pas encore démontré, que la protéine 43-K est tout ou partie de l'ionophore cholinergique. Le régulateur cholinergique résulterait donc de l'association dans la membrane de la protéine réceptrice sous sa forme la plus simple (40 K) et de la protéine 43-K (Sobel *et al* 1977, 1978).

3) *Microscopie électronique du régulateur cholinergique* (Cartaud *et al* 1978)

L'étude comparée par contraste négatif et cryodécapage de la protéine réceptrice de Torpille purifiée et sous forme membranaire (fragments de membrane riches en récepteur, membrane sous-synaptique *in situ*) permet d'identifier sans ambiguïté la protéine réceptrice *sensu stricto* aux rosettes de 80-90 nm de diamètre avec un puits hydrophile central observées à la surface des membranes qui contiennent le régulateur cholinergique. Ces rosettes s'organisent fréquemment en réseau pseudo-hexagonal mais l'analyse des images obtenues ne permet pas encore de préciser le nombre des sous-unités ni la symétrie de la molécule. La fracture de la membrane sous-synaptique *in situ* révèle des entités particulières intramembranaires dont le nombre et la distribution suit celle des rosettes de 80 nm mais la question se pose de savoir si ces particules représentent la totalité du régulateur ou seulement l'un des composants : récepteur ou ionophore. L'emploi d'immunsérums spécifiques de l'un et l'autre composant appliqué à la microscopie électronique devrait permettre de répondre à cette question.

4) *Cinétique rapide d'interaction d'un agoniste fluorescent avec le récepteur cholinergique sous sa forme membranaire* (Heidmann *et al* 1977 et 1978)

L'étude pharmacologique sur l'électroplaque de Gymnote d'une série de dérivés cholinergiques dansylés de la série suivante :



a permis de montrer que les composés avec n supérieur à 5 sont des agonistes puissants (Waksman *et al* 1976). L'interaction du composé en C_5 (C_5 DACHol) a été suivie par spectroscopie de fluorescence tant à l'équilibre (Waksman *et al* 1976) que par une méthode de mélange rapide (Heidmann *et al* 1977 et non publié). Les conditions expérimentales ont été définies pour lesquelles le signal de fluorescence obtenu par transfert d'énergie reflète presque exclusivement la liaison du C_5 DACHol sur le site récepteur. Dans un appareil de type Durrum équipé en fluorescence, le mélange rapide en moins de 2 millisecondes de la suspension de fragments de membrane avec le C_5 DACHol permet d'enregistrer un signal cinétique. Ce signal est supprimé par la préincubation des fragments de membranes avec la toxine α de *N. nigricollis* et résulte donc directement de l'interaction du C_5 DACHol avec le site récepteur.

L'analyse des tracés obtenus fait apparaître trois étapes cinétiques de premier ordre : une « rapide » de l'ordre de quelques millisecondes, une « moyenne » et une « lente » dans le domaine des secondes. On montre que la cinétique rapide résulte de l'interaction du C_5 DACHol avec des sites dans un état de haute affinité ($K_{app} > 3 \times 10^{-8}M$) : environ 17 % des sites totaux se trouvent spontanément sous cet état et leur nombre s'accroît après équilibration avec un anesthésique local, prilocaine ou SKF 535. L'interprétation de la cinétique moyenne n'est pas encore claire, par contre, il est d'ores et déjà établi que l'étape lente s'effectue avec une constante de vitesse qui atteint une valeur limite caractérisée par un temps de demi-vie voisin de 5 secondes lorsque la concentration de C_5 DACHol augmente. De plus, cette cinétique est accélérée (d'un facteur 3 environ) en présence d'anesthésique local. Ces observations révèlent l'existence d'une étape d'isomérisation cinétiquement limitante. L'interprétation la plus simple, compatible qualitativement et quantitativement avec le modèle proposé, est que la cinétique lente est en relation avec l'apparition d'états conformationnels du récepteur portant des sites de haute affinité et stabilisés tant par la liaison du C_5 DACHol que par celle des anesthésiques locaux. Cette transition pourrait correspondre à la réaction de désensibilisation. En tout état de cause, il apparaît clairement que C_5 DACHol peut être employé pour étudier les propriétés du site récepteur dans ses différents états d'affinité ainsi que leur interconversion.

5) Réintégration de la protéine réceptrice dans un environnement lipidique

La démonstration finale des rôles respectifs de la protéine réceptrice sous sa forme la plus purifiée et de la protéine 43-K sera apportée par la reconstitution d'une membrane excitable à partir de ces éléments purifiés et de lipides. Afin d'atteindre ce but, deux séries d'expériences ont été entreprises : l'interaction de la protéine réceptrice purifiée avec des monocouches

de lipides et la récupération des propriétés de liaison et des transitions conformationnelles après réintégration dans des liposomes.

Les expériences du premier type ont été entreprises en collaboration avec le laboratoire de Van Deenen (Utrecht) (Popot *et al* 1977, 1978). La protéine réceptrice de Torpille purifiée en présence de cholate est injectée sous des films de lipides purs : divers stérols dont le cholestérol, plusieurs catégories de phospholipides, etc. On enregistre une augmentation de pression superficielle qui atteint un plateau après environ 30 minutes. Cet effet n'est pas dû au détergent qui accompagne le récepteur mais à la protéine réceptrice elle-même dont l'incorporation directe peut être suivie après collections du film si le récepteur a été préalablement marqué par un ligand radioactif covalent, le MPTA par exemple. La radioactivité incorporée est bien proportionnelle à l'accroissement de surface. Dans ces conditions, l'augmentation de pression de surface varie avec la nature du lipide formant la monocouche : elle est toujours plus élevée pour les films de cholestérol que pour ceux de lécithine d'œuf ou de synthèse. Des différences de structure majeure entre molécules de phospholipide telles que remplacement de la choline par l'éthanolamine, la sérine ou l'inositol n'affectent pas de manière significative l'incorporation du récepteur. Par contre, l'incorporation semble plus efficace avec des longueurs de chaînes d'acide gras plus grandes. Il se trouve que la composition en lipides des fragments de membrane riches en récepteur révèle comme particulièrement abondants cholestérol et phospholipides à longue chaîne ceux pour lesquels la protéine réceptrice montre une affinité préférentielle. La comparaison de l'incorporation de molécules de récepteur marqué soit de manière covalente, soit de manière non covalente révèle qu'une fraction significative des molécules de récepteur s'incorpore sans se dénaturer. Ces conditions sont évidemment essentielles à connaître pour réaliser une reconstitution des propriétés fonctionnelles de la protéine réceptrice.

Dans des expériences effectuées en parallèle (Briley et Changeux 1978), la réintégration de la protéine réceptrice présente dans des extraits totaux de fragments de membrane très purifiés a été suivie de la manière suivante : soit les fragments de membrane sont solubilisés par du cholate mélangés à des lipides et dialysés, soit ceux-ci sont simplement dissous par du désoxycholate et dialysés sans ajouter de lipides, les lipides originaux des fragments de membrane servant à la reconstitution. La réintégration du récepteur est vérifiée par centrifugation en gradient de saccharose. Dans ces conditions, on constate que l'accroissement lent d'affinité de la protéine réceptrice pour les agonistes (mesuré par exemple par protection contre la liaison de toxine α) est récupéré alors que cette propriété avait été perdue par la dissolution en cholate. Par contre, l'accélération de cette cinétique par les anesthésiques locaux n'est pas reconstituée. Cette dernière observation est d'importance : soit le détergent résiduel présent bloque le site anesthésique

local (voir Brisson *et al* 1975), soit plutôt, la réassociation protéine 43-K-protéine réceptrice ne s'effectue pas dans des conditions qui permettent une interaction fonctionnelle entre site anesthésique local (ou ionophore) et site récepteur. Il va de soi que la reconstitution de cette interaction est une prémisses indispensable à la reconstitution du contrôle de la perméabilité ionique par l'acétylcholine.

6) *Phosphorylation de la protéine réceptrice de Gymnote* (Teichberg et Changeux 1977, Teichberg *et al* 1977)

Brockes et Hall (1975) ont montré sur le muscle que le récepteur sous-synaptique a un point isoélectrique (mesuré par focalisation isoélectrique) plus acide (pH 4,57) que celui du récepteur extrasynaptique (pH 4,85). Ces deux formes isoélectriques ont été retrouvées avec l'organe électrique de Gymnote qui, on le sait, contient récepteurs extra et sous-synaptiques en quantités approximativement équivalentes (Bourgeois *et al* 1972). Le traitement à 35°C en présence de fluorure de sodium d'un extrait brut en Triton X-100 de fragments de membrane fait disparaître l'espèce alcaline alors qu'en l'absence de fluorure le contraire s'observe, suggérant qu'une phosphorylation-déphosphorylation intervient dans l'interconversion entre les deux formes isoélectriques (Teichberg et Changeux 1976). De fait, un système phosphorylant existe dans l'extrait brut en détergent de fragments de membrane purifiés à partir de l'organe électrique de Gymnote (Teichberg et Changeux 1977) et de Torpille (Gordon *et al* 1977). Ces fragments migrent en gradient de saccharose vers des densités plus élevées que les fragments contenant la phosphoprotéine phosphatase et que ceux riches en récepteur cholinergique. Il n'est donc pas assuré que ces deux systèmes appartiennent à des fragments de membrane excitable. L'AMP cyclique n'a aucun effet sur la phosphorylation-déphosphorylation, mais les ions Na^+ et K^+ ont été rapportés avoir un effet (Gordon *et al* 1977). Ce même effet a pu être reproduit (en particulier inhibition par K^+ de la déphosphorylation) mais il pourrait en fait être dû à la présence de l'ATPase dépendante en Na^+ et K^+ incomplètement inhibée par la concentration d'onabaine employée par les auteurs (Teichberg et Changeux 1977, 1978). Des études récentes effectuées dans des conditions mieux contrôlées indiquent par contre que les ions Ca^{++} accroissent d'un facteur 5 le taux de phosphorylation (T. Saitoh, non publié) : contrairement aux résultats de Gordon *et al*, les effecteurs cholinergiques n'ont aucun effet.

Enfin, la démonstration sans équivoque que la protéine réceptrice est bien phosphorylée a été obtenue par la méthode d'immunoélectrophorèse à deux dimensions (Teichberg *et al* 1977). L'arc de précipité obtenu avec des anticorps antirécepteurs de Gymnote retient l' α -bungarotoxine marquée à l'iode et se marque au ^{32}P après incubation en présence de γ ^{32}P ATP et de protéine

kinase. L'analyse par électrophorèse en gel dénaturant du précipité immun révèle qu'une bande migrant avec une masse moléculaire apparente de 48 000-52 000 daltons est préférentiellement marquée par le ^{32}P (alors que Gordon *et al* 1977 trouvent que cette incorporation a lieu dans la bande de 65 000 daltons chez la Torpille). Récemment il a pu être montré par analyse électrophorétique en deux dimensions que des bandes de 40 000 et 43 000 daltons étaient ainsi phosphorylées chez le Gymnote (T. Saitoh non publié). La signification de l'ensemble de ces résultats est encore ambiguë : 1) on ne connaît pas la fonction précise des bandes de 48 000-52 000 et 65 000 daltons, il pourrait très bien s'agir de contaminants (voir § 2) ; 2) la signification physiologique d'une phosphorylation éventuelle du récepteur n'est pas claire : régulation de la perméabilité aux ions comme le veut Greengard ou facteur d'agrégation et de stabilisation du récepteur extrasynaptique en récepteur sous-synaptique au cours du développement (voir Changeux et Danchin 1976) ?

B) DEVELOPPEMENT SYNAPTIQUE :

1) Considérations théoriques

Dans le cadre du travail effectué en collaboration avec Philippe Courrège, Antoine Danchin et Jean-Michel Lasry, la formalisation détaillée d'un modèle d'immobilisation et de stabilisation de la protéine réceptrice lors de la genèse de la membrane sous-synaptique a été poursuivie et achevée. Ce modèle rend compte de la « cristallisation » différentielle du récepteur cholinergique en un seul point de la fibre musculaire (innervation focale) mais aussi en plusieurs points équidistants (innervation distribuée type *anterior latissimus dorsi* de poulet). La genèse de l'un et l'autre type d'innervation a été stimulée sur ordinateur (Courrège, Lasry, Danchin et Changeux, en préparation).

2) Jonction neuromusculaire

Le métabolisme du récepteur cholinergique au cours du développement du muscle strié et de son innervation a été étudié *in vitro* sur des myoblastes et myotubes de fœtus de veau en culture primaire (collaboration avec le groupe de François Gros), et *in vivo* sur l'embryon de poulet.

La protéine réceptrice de myotubes de veau a pu être purifiée après marquage *in vitro* par de la méthionine ^{35}S (Merlic *et al* 1978). La protéine solubilisée par le Triton X-100 est purifiée par chromatographie sur une colonne de toxine α . La désorption par le décaméthonium donne une molécule qui possède les propriétés caractéristiques de la protéine réceptrice (liaison de toxine α , coefficient de sédimentation 9 S...) mais avec un rendement peu élevé. Pour obvier cette difficulté, une désorption plus quantitative de

la protéine marquée est obtenue avec un mélange d'urée, SDS et β Mercapto-ethanol. L'analyse du produit obtenu sur gel à deux dimensions (focalisation isoélectrique + migration en SDS) révèle après fluorographie 3 catégories de taches. Une tache de masse moléculaire apparente 43 000 comigre avec l'actine, une autre de masse moléculaire apparente 46 000 est présente en quantités variables et n'est pas identifiée (sans doute il s'agit d'un contaminant). Enfin, l'espèce la plus importante migre avec une masse moléculaire apparente de 41 000 et un pI 6,5 - 6,7. Elle consiste en deux taches distinctes et une troisième moins définie plus alcaline. Cette distribution ne semble pas résulter d'une attaque protéolytique (présence simultanée de 3 inhibiteurs de protéases pendant la purification). L'analyse des cartes peptidiques obtenues par clivage du contenu de chacune de ces 3 taches au niveau des cystéines (méthode de Jacobson) ne révèle pas de différence majeure. Il s'agit donc de 3 variétés d'une même chaîne polpeptidique qui pourraient dériver les unes des autres par une modification covalente, par exemple une phosphorylation, bien que cela ne soit en aucune manière démontré.

La même méthode a été utilisée pour mesurer les taux de synthèse et de dégradation de la protéine réceptrice dans les myotubes en culture. On constate, en particulier, que des taux de dégradation très voisins sans être pour autant identiques sont obtenus en mesurant le déclin de la radioactivité spécifique de la protéine et celui de son complexe avec la toxine α . Au cours de l'évolution de la culture, la quantité totale de récepteur varie dans des limites importantes mais le taux de dégradation ne change pas (la demi-vie reste proche de 17-20 heures). La régulation du contenu en récepteur du myotube en développement porte donc sur son taux de synthèse, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Fambrough, Hall et autres avec des systèmes différents. Lors de la fusion des myoblastes en myotubes, le taux différentiel de synthèse du récepteur augmente 17 fois, en fin de culture il devient négligeable.

Une étude semblable a été effectuée *in vivo* sur un muscle particulier d'embryon de poulet avec en plus l'évolution du contenu total en acétylcholinestérase et en choline acétyltransférase (Betz *et al* 1977 et non publié). Dans le muscle pectoral le contenu total augmente jusqu'au 14^e jour puis décroît pour atteindre environ le dixième du contenu maximum au moment de l'éclosion. L'estérase et la transférase par contre ne montrent aucun signe de décroissance au même moment. L'analyse autoradiographique de la distribution du récepteur marqué par la toxine α montre que la diminution du contenu total en récepteur coïncide avec la disparition du récepteur extrasynaptique qui est évidemment majoritaire. Au même moment, une fraction relativement faible de ce récepteur extrasynaptique s'accumule sous la terminaison nerveuse. Le temps de vie du récepteur global mesuré par marquage *in vivo* avec ^{125}I α -bungarotoxine ne change pas de manière significative au

cours de l'évolution du muscle. Dans l'embryon, comme *in vitro*, la régulation du contenu total en récepteur extrasynaptique porte sur le taux de synthèse du récepteur et pas sur sa dégradation.

L'hypothèse que l'activité spontanée de l'embryon (qui apparaît dans 3 jours 1/2 de développement embryonnaire) intervient dans cette régulation (Changeux et Danchin 1976) a été mise à l'épreuve en bloquant chroniquement la contraction neurogène des muscles de l'embryon par un curarisant de synthèse : le flaxédil. En accord avec les résultats de Giacobini *et al* (1973) on constate que le dépôt d'acétylcholinestérase sous-synaptique révélé par la réaction de Koelle est beaucoup moins important dans les embryons paralysés que dans les contrôles. Cependant, dans les mêmes embryons, on constate que l'accumulation de récepteur sous-synaptique est normale (Bourgeois, non publié). Estérase et récepteur sont donc soumis à des régulations différentes et l'état d'activité du muscle, en accord avec les résultats récents de Lomo et Slater, affecte beaucoup plus directement la localisation de l'estérase que celle du récepteur. Enfin, il a pu être montré que le blocage chronique de la jonction neuromusculaire s'accompagne du maintien d'un contenu élevé en récepteur extrasynaptique. En d'autres termes, la paralysie du muscle s'oppose à la perte de récepteur. Dans l'embryon paralysé, le temps de vie du récepteur, encore, ne change pas. La paralysie du muscle maintient un taux de synthèse élevé. L'activité spontanée du muscle provoque donc *in vivo* un arrêt de la synthèse de récepteur extrasynaptique (H. Betz, non publié).

Une des étapes finales de la maturation de la jonction neuromusculaire est l'établissement de la relation 1 fibre nerveuse motrice - 1 fibre musculaire consécutive à la régression d'une multi-innervation transitoire. L'hypothèse que l'état d'activité du muscle et de son innervation intervient dans cette stabilisation sélective a été mise à l'épreuve chez le rat adulte. Après section du nerf soléaire, une réinnervation du muscle a lieu et MacArdle a décrit qu'au cours du processus de réinnervation le phénomène de multi-innervation transitoire s'observait comme dans le cas du développement normal. L'application d'un manchon d'anesthésique local sur le nerf en régénération bloque l'activité électrique du nerf (et aussi celle du muscle) et du même coup provoque un ralentissement significatif de l'évolution de la multi-innervation (Benoit et Changeux 1977). Comme le propose la théorie, l'activité du système nerf-muscle commande, directement ou indirectement, la stabilisation sélective d'une fibre motrice par fibre musculaire.

3) Cervelet

Le travail a porté sur le cervelet du rat qui a fourni l'essentiel du matériel biochimique, et de la souris ainsi que de quelques-uns de ses mutants neuropathologiques. Les mutants étudiés étaient le *weaver* chez qui manquent les

cellules des grains, *nervous* et *Purkinje cell degeneration* (PCD) qui présentent un déficit des cellules de Purkinje chez l'adulte, *staggerer* chez qui la synapse fibre parallèle-cellule de Purkinje ne se forme pas normalement, enfin *reeler* qui présente un déficit dans la migration des cellules de Purkinje.

a) Etudes biochimiques et immunologiques sur la protéine P400 spécifique des cellules de Purkinje du cervelet (Mikoshiba et Changeux 1978, non publié). Dans un travail précédent, il a été montré qu'une protéine membranaire de masse moléculaire apparente 400 000 (en gel dénaturant SDS) est présente dans les cellules de Purkinje isolées du cervelet de rat, manque dans les cervelets de souris « *nervous* » et semble donc caractéristique des cellules de Purkinje (Mallet *et al* 1976). Il a d'abord été confirmé que cette protéine, appelée P400, manque chez le mutant PCD qui comme *nervous* présente un déficit marqué des cellules de Purkinje. Ensuite, une méthode de détection de la protéine P400 sur gel dénaturant, beaucoup plus sensible que la coloration par le bleu de Coomassie, a été mise au point. Elle se fonde sur l'observation que la protéine P400 est une glycoprotéine (la partie glucidique représente approximativement 40 % de la masse totale) et peut donc se marquer *in situ* sur le gel dénaturant, préalablement débarrassé du SDS, par une lectine radioactive. Parmi les lectines essayées (Concanavaline A, lectine du haricot, du germe de blé, ricine) seule la Concanavaline A radioactive se fixe efficacement. De ce fait, on peut détecter des quantités très faibles de protéine P400 par autoradiographie. Utilisant cette méthode, il a été confirmé que la protéine P400 est absente du cerveau, foie, rein, pancréas, rate et cœur. Dans le cervelet de *staggerer*, contrairement aux premières observations, une fraction significative de P400 persiste (38 % du contrôle), par contre *weaver* et *reeler* montrent des accroissements significatifs de 142 et 122 % par rapport au contrôle.

L'évolution de la protéine P400 au cours du développement postnatal a été suivie par électrophorèse en gel SDS. La protéine P400 est présente immédiatement après la naissance et son contenu par poids de cervelet humide augmente jusqu'au 15^e jour après la naissance. Elle est donc présente au moment où s'établissent les synapses fibres parallèles-cellules de Purkinje.

Une méthode de purification de cette protéine a été mise au point à partir d'une fraction membranaire microsomale par extraction successive avec des détergents non dénaturants : Triton X-100, cholate de Na, la protéine P400 restant particulaire. L'analyse de la composition en acides aminés de la protéine P400 révèle un contenu particulièrement élevé en glutamate, glycine et aspartate.

Des anticorps dirigés contre la protéine P400 purifiée (mais dénaturée) ont été obtenus chez le lapin et purifiés. Une réaction positive par la méthode d'Avraméas (immunoperoxydase) a été détectée sur les cellules de Purkinje

isolées mais pas sur les cellules des grains. Ceci confirme évidemment la localisation de la protéine P400 dans les cellules de Purkinje.

b) Propriétés comparées de la couche des grains et de la couche moléculaire du cervelet de bœuf isolées (Mikoshiha et Changeux 1978). Couches des grains, moléculaires et substance blanche sont disséquées à la main et sous la loupe binoculaire à partir de tranches de cervelet de bœuf dans un milieu physiologique. L'électrophorèse en gel SDS des tissus disséqués montre que la protéine P400 se retrouve dans la couche moléculaire même en l'absence de somas des cellules de Purkinje : elle est donc présente dans les dendrites des cellules de Purkinje et pas seulement dans leur soma. Les histones F₁, F_{2A}, F_{2B}, F₃ sont abondantes dans la couche des grains purifiés dont le contenu en ADN est approximativement 10 fois plus élevé que celui des autres couches. Après homogénéisation des couches, moléculaires et des grains, disséquées sont toujours capables de retenir des acides aminés radioactifs. La vitesse d'incorporation du L-³H-glutamate est environ 9 fois plus élevée dans la couche moléculaire que dans la couche granulaire. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse que le glutamate est le transmetteur des fibres parallèles (cellules des grains).

Il a d'autre part été observé au cours de ces expériences que des synaptosomes fixant le ³H-glutamate se séparent de ceux fixant l'acide ¹⁴C- γ -aminobutyrique. Ceci devrait permettre de purifier les synaptosomes qui fixent le glutamate qui, très vraisemblablement, résulte de la fragmentation des fibres parallèles.

c) La liaison de l'acide γ -aminobutyrique sur diverses préparations de cervelet (Olsen et Mikoshiha 1978). L'acide γ -aminobutyrique est le transmetteur des interneurons inhibiteurs et des cellules de Purkinje dans le cervelet. Un test de liaison de ³H-Gaba récemment mis au point permet de détecter des sites qui, très vraisemblablement, sont ceux du récepteur physiologique de ce neurotransmetteur. On montre que ces sites de liaison sont 6-7 fois plus abondants (par masse de protéine) dans la couche granulaire que dans la couche moléculaire isolée. Une perte d'un facteur 3-4 s'observe d'autre part chez les mutants *weaver*, *reeler* et *staggerer* (qui présentent tous un déficit en cellules des grains) mais pas chez le mutant *nervous*. L'ensemble de ces résultats indique que les cellules des grains possèdent des récepteurs du Gaba en quantité abondante et reçoivent donc de nombreuses synapses Gaba-ergiques.

d) Immunologie des diverses catégories cellulaires du cervelet (Mallet *et al*, non publié). L'immunisation de lapins à partir de cellules de Purkinje et de cellules des grains purifiées a été poursuivie et des sérums dirigés contre chacune de ces catégories cellulaires obtenues. Il n'a pas été possible de montrer que les sérums antigraains contenaient des anticorps dirigés contre

les antigènes spécifiques des cellules des grains. Par contre, il a été possible de purifier des *immunoglobulines* dirigées spécifiquement contre des antigènes propres aux cellules de Purkinje par adsorption sur des membranes de cerveau suivie de désorption à pH acide. Des fragments FAB₂ ont aussi été préparés. Enfin, l'étude de l'effet du sérum anti-Purkinje sur la synaptogénèse *in vitro* (explants de cerveau de rat nouveau-né) a été poursuivie en collaboration avec Alain Privat (Hôpital Port-Royal). Un effet du sérum anti-Purkinje sur les cellules de Purkinje semble s'observer mais mérite d'être confirmé. L'identification des déterminants de surface intervenant dans les premiers stades du développement synaptique paraît faisable.

e) Etude du cerveau du mutant « reeler ». Le cerveau de la souris « reeler » résulte du curieux emboîtement d'une masse dense et profonde de cellules de Purkinje par un cortex cérébelleux quasi normal avec entre les deux des cellules de Purkinje dispersées, comme arrêtées dans leur migration. L'étude biochimique de ce cerveau a permis de montrer une chute massive du contenu en ADN due à un déficit majeur en cellules des grains. Peut-être que la prolifération normale de celles-ci requiert une distribution adéquate des cellules de Purkinje (émission d'un facteur dendritique ?). Il ressort clairement des études anatomiques et électrophysiologiques que des synapses « hétérologues » s'établissent entre partenaires qui normalement ne forment pas de contacts fonctionnels : par exemple entre fibres moussues et dendrites des cellules de Purkinje. La mise en place d'une synapse ne requiert donc pas une spécificité de reconnaissance entre surfaces cellulaires aussi stricte que le prévoit l'hypothèse de Sperry. Enfin, on sait que chez l'animal adulte il existe une relation 1-1 entre cellule de Purkinje et fibre grimpeuse. Comme dans le cas de la jonction neuromusculaire, cette relation s'établit par l'intermédiaire d'un stade de multi-innervation transitoire (Crepel *et al* 1976). On constate par des méthodes électrophysiologiques que cette multi-innervation persiste chez l'adulte « reeler » au niveau des cellules de Purkinje de la masse centrale alors qu'elle se réduit à la relation 1-1 au niveau des cellules de Purkinje du cortex périphérique. Tout se passe comme si les cellules des grains (absentes de la masse centrale) gouvernaient la régression de la multi-innervation grimpeuse des cellules de Purkinje de manière transsynaptique et rétrograde. Cet effet est évidemment en accord avec les prédictions de la théorie (Mariani *et al* 1977).

PUBLICATIONS

A. SOBEL et J.P. CHANGEUX, Purification and characterization of the cholinergic receptor protein in its membrane bound and detergent soluble forms from the electric organ of *Torpedo marmorata*, II^e Congresso nazionale

della Societa Italiana di Biochemica (oct. 1976). (*Biochemical Society Transactions*, 511-514, 1977.)

J. MARIANI, F. CRÉPEL, K. MIKOSHIBA, J.P. CHANGEUX et C. SOTELO, *Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from reeler mutant mouse*. (*Philosophical transactions of the Royal Society Londres*, 281, 1-28, 1977.)

V.I. TEICHBERG, A. SOBEL et J.P. CHANGEUX, *In vitro phosphorylation of the acetylcholine receptor*. (*Nature*, 267, 540-542, 1977.)

J. CARTAUD, L. BENEDETTI, A. SOBEL et J.P. CHANGEUX, *A morphological study of the cholinergic receptor protein from Torpedo marmorata in its membrane environment and in its detergent extracted purified form*. (*J. of Cell Science*, 29, 313-337, 1978.)

H. BETZ, J.P. BOURGEOIS et J.P. CHANGEUX, *Evidence for degradation of the acetylcholine (nicotinic) receptor in skeletal muscle during the development of the chick embryo*. (*FEBS Lett.*, 77, 219-224, 1977.)

K. MIKOSHIBA et J.P. CHANGEUX, *Morphological and biochemical studies on isolated molecular and granular layers from bovine cerebellum*. (*Brain Research*, 142, 487-504, 1978.)

H.H. GRÜNHAGEN, M. IWATSUBO et J.P. CHANGEUX, *Fast kinetic studies on the interaction of cholinergic agonists with the membrane-bound acetylcholine receptor from Torpedo marmorata as revealed by quinacrine fluorescence*. (*Eur. J. Biochem.*, 80, 225-242, 1977.)

A. SOBEL, M. WEBER et J.P. CHANGEUX, *Large scale purification of the acetylcholine receptor protein in its membrane bound and detergent extracted forms from Torpedo marmorata electric organ*. (*Eur. J. Biochem.*, 80, 215-224, 1977.)

V.I. TEICHBERG et J.P. CHANGEUX, *The phosphorylation of the acetylcholine receptor : hypothesis regarding its functional significance*. (In « *The biochemistry of Myasthenia gravis and muscular dystrophy* », éd. G.G. Lunt & R.M. Marchbanks, 23-39, Academic Press.)

P. BENOIT et J.P. CHANGEUX, *Effect of nerve activity on the evolution of multi-innervation at the regenerating neuromuscular junction of the rat*. (*Brain Research*, 149, 89-96, 1978.)

J.P. CHANGEUX et K. MIKOSHIBA, *Genetic and « epigenetic » factors regulating synapse formation in vertebrate cerebellum and neuromuscular junction*. « *Neurobiology on the neuron and the glia* » 2nd Neurobiology Seminar 1977 (éd. Yuzo Tsukada, Kyoritsu-Shupan, Tokyo, Japan).

H. BETZ, *Protein degradation during the differentiation of eucaryotic cells : studies on the sporulation of saccharomyces cerevisiae and on the formation of the neuromuscular junction in the chick embryo. Acta Biol. Med. German., 1977 (Proc. 3rd Symp. Int. Protein Catabolism).*

M. BRILEY et J.P. CHANGEUX, *Recovery of some functional properties of the detergent extracted cholinergic receptor protein from Torpedo marmorata after reintegration into a membrane environment. (Eur. J. Biochem., 84, 429-439, 1978.)*

A. SOBEL, T. HEIDMANN, J. HOFER et J.P. CHANGEUX, *Separation and purification from Torpedo marmorata membranes of distinct protein components carrying the acetylcholine receptor site and a binding site for local anesthetics and histrionicotoxin. (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 75, 510-514, 1978.)*

T. HEIDMANN et J.P. CHANGEUX, *Structural and functional properties of the acetylcholine receptor protein in its purified, and membrane-bound states. (Annual Review of Biochemistry, 47, 371-411, 1978.)*

J.L. POPOT, R.A. DEMEL, A. SOBEL, L.L.M. VAN DEENEN et J.P. CHANGEUX, *Affinité préférentielle de la protéine réceptrice de l'acétylcholine pour certains lipides révélée par la méthode des monocouches (C.R. Acad. Sci. Paris, 285 D, 1005-1008, 1977.)*

J.P. MERLIE, J.P. CHANGEUX et F. GROS, *Skeletal muscle acetylcholine receptor : purification characterization and turnover in muscle cell cultures. (J. Biol. Chem., 253, 2882-2891, 1978.)*

R.W. OLSEN et K. MIKOSHIBA, *Gamma-aminobutyric acid receptor binding in granule cells of mammalian cerebellum and depletion in agranular mutant mice. (J. of Neurochemistry, 30, 1633-1636, 1978.)*

A. SOREL, T. HEIDMANN et J.P. CHANGEUX, *Purification d'une protéine liant la quinacrine et l'histrionicotoxine à partir de fragments de membrane riches en récepteur cholinergique de Torpedo marmorata. (C.R. Acad. Sci. Paris, 285 D, 1255-1258, 1977.)*

J.L. POPOT, R.A. DEMEL, A. SOBEL, L.L.M. VAN DEENEN et J.P. CHANGEUX, *Interaction with lipid monolayers of the acetylcholine (nicotinic) receptor protein from Torpedo marmorata electric organ. (Eur. J. Biochem., 85, 27-42, 1978.)*

A. SOBEL, J.L. POTOT, T. HEIDMANN et J.P. CHANGEUX, *The cholinergic receptor protein from fish electric organ and its lipidic environment - structural and functional properties. (Euratom - Interdisciplinary training course - September 1977.)*

J.P. BOURGEOIS, J.L. POPOT, A. RYTER et J.P. CHANGEUX, *Quantitative studies on the localisation of the cholinergic receptor protein in the normal and denervated electroplaque from Electrophorus electricus. (J. of Cell Biology, in press, 1978.)*

CONFERENCES DONNEES SUR INVITATIONS A DES CONGRES
COLLOQUES ET SYMPOSIUM INTERNATIONAUX

Jean-Pierre CHANGEUX :

- The second seminar for neurobiology - Tokyo (Japon). Janvier 1977.
- Neuromuscular disorders - Bath (Angleterre). Mars-avril 1977.
- Dynamics and regulation of evolving systems - Schloss Elmau (République fédérale allemande). Mai 1977.
- Sixième conférence internationale « de la physique théorique à la biologie » - Institut de la Vie, Versailles (France). Juin 1977.
- N.R.P. Intensive Study Program - Boulder, Colorado (U.S.A.), Juin-juillet 1977.
- 10th International Summer School of Brain Research - Amsterdam (Hollande). Juillet 1977.
- XXVII^e Congrès international des Sciences physiologiques - Paris (France). Juillet 1977.
- Maturational aspects of neurotransmission mechanisms - Saint-Vincent (Italie). Août 1977.
- The eleventh Harden Conference - Ashford (Angleterre). Septembre 1977.
- The William Draper Harkins Memorial Lecture - Chicago (U.S.A.). Octobre 1977.
- Structure and Development of the nervous system - Rehovot (Israël). Octobre 1977.
- Conférences I.N.S.E.R.M. - Blois (France). Novembre 1977.

Cassian BON :

- Régulations d'origine membranaire - Roscoff (France). Novembre 1977.

Heinrich BETZ :

- 3rd International Symposium on Intracellular Protein Catabolism - Reinhardsbrunn (Allemagne de l'Est). Mai 1977.
- Joint Meeting of the Biochemical Societies of Germany, France and Switzerland - Freiburg (République fédérale allemande). Octobre 1977.

Jacques MALLET :

- N.R.P. Intensive Studi Programm - Boulder, Colorado (U.S.A.). Juin-juillet 1977.
- Seminars : Harvard Medical School - University of Chicago - U.C.L.A. - Salk Institute (U.S.A.). Juin-juillet 1977.

Jean-Luc POPOT :

— Interdisciplinary training course (EURATOM) - Orléans (France). Septembre 1977.

André SOBEL :

— Neuromuscular disorders - Bath (Angleterre). Mars-avril 1977.

— Interdisciplinary training course (EURATOM) - Orléans (France). Septembre 1977.

— Structure and Development of the nervous system - Rehovot (Israël). Octobre 1977.

— Conférences I.N.S.E.R.M. - Blois (France). Novembre 1977.

Vivian TEICHBERG :

— Neuromuscular disorders - Bath (Angleterre). Mars-avril 1977.

— Meeting of the Biochemical Society - Brighton (Angleterre). Avril 1977.

— EMBO course on « New developments in membrane bound enzymes » - Francfort (République fédérale allemande). Mai 1977.

— XXVII^e Congrès international des Sciences physiologiques - Paris (France). Juillet 1977.

— Structure and Development of the nervous system - Rehovot (Israël). Octobre 1977.

DISTINCTION

— Prix A. Johannidès, Académie des Sciences, Paris, décembre 1977.