

## Communications cellulaires

M. Jean-Pierre CHANGEUX, professeur

Le cours de cette année intitulé « Analyse génétique de l'organisation fonctionnelle du système nerveux » a été introduit par une brève récapitulation de nos connaissances sur l'organisation du génome chez les eucaryotes.

Une première partie a été consacrée à la *Drosophile*, un insecte, qui possède un système nerveux relativement simple et se prête à l'analyse génétique. Les données, plus fragmentaires, obtenues avec les mammifères, principalement la souris, ont ensuite été confrontées aux interprétations et conclusions tirées de l'étude de la *Drosophile* et d'importantes analogies mises en évidence entre les deux systèmes. Enfin, quelques exemples de déterminisme génétique de comportements intégrés chez des insectes et des vertébrés ont été présentés. Les effets de l'environnement sur le développement du système nerveux, d'emblée limités par l'importante contrainte génétique qui ressort des faits présentés cette année, seront discutés l'an prochain.

Le génome du colibacille, et plus particulièrement l'opéron lactose, constitue, qu'on le veuille ou non, le modèle de référence de l'organisation du génome chez les eucaryotes. Des découvertes récentes ont, toutefois, mis en évidence des différences remarquables entre les deux systèmes. Le chromosome circulaire du colibacille est composé d'une seule molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) de masse moléculaire  $2,3 \times 10^9$  et de 1,2 mm de longueur sous sa forme déroulée. Si on compte qu'un gène de taille moyenne comporte environ 400 triplets de paires de base, il devrait y avoir environ 3 000 gènes par bactérie. La masse du génome diploïde de la *Drosophile* est seulement 24 fois plus élevée que celle du colibacille, celui de la souris, du bœuf et de l'homme environ 600 fois plus. L'accroissement du nombre de gènes n'est pas parallèle à celui de la masse totale du génome puisque chez les eucaryotes une partie importante de l'ADN est de type répétitif (environ 45 % chez le veau) et ne peut être considéré comme faisant partie des séquences codantes. On estime que chez la *Drosophile* le nombre de gènes

codants est voisin de 5 000-6 000. Il se situe entre 20 000 et 100 000 chez les mammifères.

L'opéron lactose comprend trois gènes adjacents qui déterminent, respectivement, la structure de la  $\beta$  galactosidase, de la  $\beta$  galactoside perméase et de la transacétylase. Leur transcription en acide ribonucléique messenger (ARN) est normalement bloquée par une protéine régulatrice ou répresseur (Jacob et Monod, 1961). En présence d'un  $\beta$  galactoside « inducteur » le répresseur se détache du chromosome et libère l'expression de l'opéron. Le répresseur se fixe sur un segment de 27 paires de base, ou opérateur, qui se trouve en partie transcrit dans l'ARN messenger de l'opéron. Sa séquence présente une symétrie d'ordre 2 qui, vraisemblablement, correspond à celle de la molécule de répresseur. La transcription de l'opéron libéré du répresseur, est le fait de deux protéines : l'ADN-ARN polymérase et la protéine CAP qui possède un site de liaison de l'AMP cyclique (la protéine est fonctionnelle lorsqu'elle lie l'AMP cyclique et le niveau intracellulaire d'AMP cyclique tombe en présence de glucose, inhibiteur puissant de l'induction par les  $\beta$  galactosides). CAP et polymérase interagissent avec une séquence particulière de l'ADN chromosomique longue d'environ 122 paires de base : le promoteur. A ce niveau, une déstabilisation, directe ou indirecte, de la double hélice se produit et permet la mise en route de la transcription par la polymérase. La transcription s'arrête au niveau de signaux « stop » différents de ceux qui terminent la traduction du messenger en chaînes polypeptidiques. La régulation de la synthèse protéique chez le colibacille s'interprète donc intégralement sur la base de mécanismes moléculaires agissant au niveau de la transcription. La masse d'ADN engagée dans la régulation de l'opéron lactose représente environ 1/6 de la masse totale des gènes de structure de celui-ci.

Chez la bactérie, une correspondance non ambiguë et univoque existe entre la séquence de bases d'un gène de structure chromosomique et la séquence d'acides aminés résultant de la traduction de l'ARN messenger.

Chez les eucaryotes ce n'est pas le cas. Il a été découvert récemment par plusieurs groupes (Glover, Flavell, Chambon et Kourilsky, etc.) que des séquences importantes du gène chromosomique, ou « introns », ne se retrouvent pas dans la séquence du messenger codant et donc de la chaîne polypeptidique. C'est le cas des gènes des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine, des  $\gamma$ -globulines, de l'ovalbumine de l'œuf de poule... Le gène de l'ovalbumine comporte 7 900 paires de base mais le messenger codant n'a que 1 900 nucléotides. La différence se retrouve dans 6 à 10 introns dont la masse en ADN constitue environ les 3/4 de la masse du gène. Le gène d'ADN est en fait intégralement transcrit en un ARN pré-messenger qui subit ensuite une maturation par découpage (excision des introns) suivie d'assemblage en messenger codant. Les introns sont donc transcrits mais non traduits. Leur signification fonctionnelle n'est

pas claire. Evolutive ? Ils permettraient de créer rapidement de nouvelles espèces protéiques par un assemblage — en pièces détachées — de fragments de gènes. Régulatrice ? Leur présence bloque la traduction et une régulation de celle-ci pourrait être envisagée au niveau des enzymes de maturation du pré-messager.

De fait, une des caractéristiques de la cellule eucaryote est que dans un état différencié donné, seule une fraction souvent faible mais bien définie du génome est transcrite puis traduite. L'identification du nombre et de la nature des gènes transcrits se réalise d'une manière globale mais souvent ambiguë par des expériences d'hybridation entre ADN chromosomique et ARN messenger codant (ou ADN complémentaires de celui-ci). Certains auteurs estiment ainsi que dans certains tissus très spécialisés comme le cristallin, il n'y aurait pas plus de 3 000 gènes traduits en séquences uniques d'ARN messenger. Dans l'oviducte et le foie, organes soumis à une régulation hormonale, il y en aurait 13 000. Le cerveau et l'utérus rivaliseraient pour la plus grande diversité en ARN messagers avec, respectivement, 50 000-100 000 séquences et 36 000-55 000, soit très près du nombre maximum de gènes de structure. Quoiqu'il en soit, il est clair que l'état différencié peut se définir par un état d'expression particulier du génome et plus précisément par une « carte » des gènes actifs. Il est aussi vraisemblable qu'à la régulation portant sur la synthèse ou la maturation des messagers codants peuvent s'ajouter d'autres régulations comme celle par exemple de la stabilité des messagers.

L'existence de séquences répétitives et d'introns réduit de manière significative le nombre de gènes disponibles pour déterminer l'organisation du système nerveux dont la complexité paraît considérable par rapport à celle du génome. Il faut d'emblée remarquer que cette complexité se construit progressivement et de manière séquentielle au cours du développement embryonnaire. Pour Wolpert et Lewis (1975) la cellule embryonnaire peut être comparée à un automate (von Neumann) qui ne pourrait évoluer que vers un petit nombre d'états, par exemple 2. Le choix en faveur de l'un ou l'autre de ces états — chacun pouvant se définir par une « carte » ou répertoire de gènes actifs — est déterminé par un signal oui/non. Chaque choix une fois effectué, détermine les options possibles du choix suivant. Si l'on dispose seulement de 2 signaux oui/non, il y a  $2^{20}$  c'est-à-dire un million de manières différentes d'assigner à la cellule son état final. Il apparaît donc possible, au moins théoriquement, d'expliquer une diversification importante de types cellulaires à partir d'un nombre relativement restreint de déterminants géniques.

La génétique moderne est née au début de ce siècle avec Morgan et la *Drosophile* pour d'excellentes raisons. Cette petite mouche a un cycle de reproduction très bref (environ 10 jours d'œuf à œuf), son génotype est

simple (4 paires de chromosomes dont une hétéromorphe chez le mâle (X Y)), la masse totale d'ADN par noyau se situe à mi-chemin entre le colibacille et l'homme. Enfin la *Drosophile* possède les principaux types d'organes d'un animal supérieur et en particulier un système nerveux bien différencié composé d'environ 100 000 neurones. Le projet de Morgan était d'expliquer le développement embryonnaire en termes d'expression différentielle de gènes (voir son livre « Embryologie et Génétique »). Eclipsée pendant plusieurs décennies par le colibacille, la *Drosophile* retrouve aujourd'hui tout son intérêt pour analyser en ces termes, tant les premières étapes de l'embryogenèse, qui conduisent, en particulier, à la détermination de l'ébauche nerveuse, que les étapes finales du développement de celle-ci.

Le développement embryonnaire dure 22 heures de la fécondation à l'éclosion de la première larve. White répertoriait en 1970 plus de 70 mutations ou déficits chromosomiques létaux qui bloquent le développement embryonnaire à des étapes séparées parfois par moins d'un quart d'heure. Par exemple, l'absence de chromosome X empêche la formation du blastoderme (1 heure), la délétion de sa moitié droite donne des embryons avec un blastoderme incomplet (1-2 heures), la délétion de sa moitié gauche bloque l'étape suivante de gastrulation (2-3 heures), la délétion *notch* 8 ne permet pas la séparation du tube nerveux du reste de l'ectoderme (6 heures).

L'emploi judicieux de mutations létales qui affectent ces premières étapes permet de pousser l'analyse plus loin et en particulier de distinguer : 1) les gènes qui s'expriment au cours du développement embryonnaire proprement dit et 2) ceux dont les produits s'accumulent dans le cytoplasme de l'œuf au cours de l'ovogenèse et servent de signaux régulateurs dans l'expression des précédents. Dans ce dernier cas le phénotype de la mutation est déterminé par le génotype de la mère et non par celui de l'embryon. On dit qu'il y a effet maternel. Certaines mutations de ce type localisées sur le chromosome 3 affectent différemment le clivage du blastoderme (Rice et Garen, 1975) ou la gastrulation (Garen et Gehring, 1972). L'injection du cytoplasme d'œufs vierges normaux dans des embryons issus d'homozygotes pour la mutation corrige les effets de la mutation (Gehring). Ce résultat confirme l'existence de déterminants cytoplasmiques qui apparaissent à un stage précis de l'ovogenèse et règlent l'expression des gènes aux stades précoces de l'embryogenèse.

Les étapes ultérieures du développement peuvent, elles aussi, être affectées sélectivement par des mutations ponctuelles. On doit distinguer avec C. Stern (1953) les gènes dont la mutation affecte la différenciation d'un type cellulaire particulier, ou gènes de cytodifférenciation, de ceux qui règlent l'organisation des cellules ou des tissus entre eux ou « pattern genes ». Un exemple particulièrement intéressant de cette dernière catégorie est celui de gènes *homéotiques* dont la mutation entraîne chez l'adulte le remplacement d'une partie du corps par une autre normalement trouvée à un

endroit différent : une patte à la place d'un œil (*ophthalmoptera*), une patte à la place d'une antenne (*spineless aristapedia*), une demi-aile à la place d'une haltère (*bithorax*). On comprend le mode d'action de ces gènes en se rappelant que les organes de l'adulte dérivent de disques imaginaires qui s'assemblent comme des pièces de « Meccano » pendant la métamorphose nymphale. Ces disques imaginaires se développent et se différencient pendant la vie larvaire mais sont déterminés très précocement, au stade du blastoderme cellulaire, environ 3 heures après la fécondation. A ce stade ils sont composés de 10 à 40 cellules seulement et se trouvent confrontés à un choix qui décidera de leur avenir. Les gènes homéotiques entrent alors en action et décident de ce choix. Leur action, ou le produit (thermolabile) de leur action, est toutefois requise en permanence jusqu'à un stade tardif du développement. Les gènes homéotiques seraient donc des gènes de régulation majeurs dont le produit interviendrait dans la détermination d'organes entiers, d'une manière de tout-ou-rien comme le postule le modèle « automate » de Wolpert et Lewis. Un gène homéotique (*bithorax*) vient d'être cloné. Le développement embryonnaire de la *Drosophile* peut désormais être analysé par les méthodes très puissantes du génie génétique.

Un des avantages majeurs de la *Drosophile* pour l'analyse des stades tardifs de la neurogenèse est qu'il est matériellement possible de sélectionner des mutants sur un caractère que l'on choisit. Benzer a mis au point un protocole de fractionnement d'une population de mouches adultes — inspiré de la méthode par distribution à contre-courant (employée pour la purification des protéines) et qui conduit à l'isolement de mutants sur la vision, l'olfaction, la motricité... Par une méthode d'inspection anatomique systématique Heisenberg a réussi à examiner plus de 3 000 cerveaux de *Drosophile* et a identifié près de 60 mutants « topologiques » différents.

Il est aussi possible, avec la *Drosophile*, d'identifier la cible anatomique primaire de la mutation. La méthode consiste à réaliser des individus dont le corps est une « mosaïque » de tissus de génotypes différents par exemple  $x'x$  (mâle) et  $x'o$  (femelle). Si  $x'$  porte le gène muté de manière récessive, les tissus mâles auront le phénotype sauvage et les tissus femelles le phénotype mutant. La mosaïque des tissus de l'adulte est déterminée par la mosaïque des noyaux de l'embryon au stade du blastoderme cellulaire (3 heures). Plus ces noyaux sont topologiquement voisins dans l'embryon, plus la probabilité est grande pour qu'ils aient le même génotype dans une mosaïque adulte. L'analyse quantitative de la fréquence de l'apparition du même génotype entre des points précis de l'organisme chez un grand nombre d'individus mosaïques différents permet en sens inverse d'établir une carte des ébauches présomptives et de localiser le *focus* de la mutation (Sturtevant, Benzer). Cas simples : les mutants phototactiques présentant un électroréti-

nogramme anormal, le focus se trouve sur la carte au niveau de l'œil ou tout près de l'œil. Cas plus intéressant : le mutant *hyperkinetic* dont les pattes tremblent de manière désordonnée lorsque la mouche est anesthésiée. Où est la lésion, au niveau du muscle ou du système nerveux ? Hotta et Benzer ont identifié 3 foci, un pour chaque paire de pattes, localisés à l'emplacement des ébauches de la chaîne nerveuse ventrale. La mutation affecte donc les neurones moteurs, ce que confirme l'électrophysiologie.

L'œil composé de la *Drosophile*, par la régularité et la simplicité relative de son organisation, se prête à l'analyse génétique. La réponse électrique globale de la rétine ou électrorétinogramme est composée de plusieurs « ondes » : 2 ondes transitoires et brèves « on » et « off » encadrant une onde négative soutenue. Chez le mutant *tan* (Pak ; Hotta et Benzer, 1969) les ondes transitoires disparaissent ; le même effet est observé chez l'animal normal en présence de tétrodontoxine qui abolit le potentiel d'action. Les ondes brèves sont donc produites par la propagation du potentiel d'action vraisemblablement dans les axones des cellules photoréceptrices. Chez le mutant X12 (Alawi, 1972), l'électrorétinogramme est plat mais les enregistrements intracellulaires montrent que les propriétés des membranes des cellules rétinienne sont normales. Le pigment rétinien est lui aussi normal. Le déficit se situe donc au niveau du système de couplage assurant la phototransduction.

L'unité fonctionnelle de l'œil composé, ou ommatidie, est constituée par 8 cellules photoréceptrices ((R1 à R8) entourées de 6 cellules pigmentaires. Chaque cellule réceptrice possède une formation membranaire ou rhabdomère qui contient le pigment visuel. La mesure de l'électrorétinogramme en fonction de la longueur d'onde du stimulus lumineux permet de définir 3 profils de sensibilité spectrale de l'œil de la *Drosophile* : 1) haute sensibilité, adaptable, dans les longueurs d'ondes visibles ; 2) sensibilité à l'U.V. ; 3) sensibilité au bleu non adaptable. Chez le mutant *sev*, le rhabdomère R7 est absent, chez *rdg B* et *ora*, R1 à R6 ne se forment pas, chez le double mutant *sev-ora*, R1 à R7 manquent. L'analyse des profils de sensibilité de ces mutants (Harris, 1976) permet de conclure que les photorécepteurs R1 à R6 sont responsables de la sensibilité de type 1, R7 de la sensibilité à l'U.V. et R8 de celle au bleu non adaptable.

Quel mécanisme morphogénétique est responsable de la régularité quasi « cristalline » de l'organisation de l'œil de la *Drosophile* ? L'hypothèse en apparence la plus plausible et la plus couramment acceptée était que celle-ci résultait de la régularité dans le temps et dans l'espace des divisions des cellules précurseurs des divers types cellulaires de l'œil (hypothèse clonale). Par exemple une première division conduirait aux deux précurseurs de la moitié inférieure (cellules pigmentaires) et de la moitié supérieure de l'ommatidie, cette dernière donnant, après 3 divisions successives, les 8 cellules

photoréceptrices. Des mosaïques ont pu être réalisées (par recombinaison somatique après irradiation X) entre tissus homozygotes ou hétérozygotes pour la mutation *white*. Les cellules homozygotes se reconnaissent histologiquement par l'absence de pigment chez les photorécepteurs *et* les cellules pigmentaires. Si l'hypothèse clonale était vérifiée, une régularité devrait apparaître au niveau de la distribution des divers types cellulaires au sein des ommatidies mosaïques. Or, il n'en est rien et n'importe quelle paire de cellules prise au hasard peut présenter des génotypes différents. Le développement de l'œil ne dépend pas de relations clonales (Benzer). Sa régularité résulte d'une croissance polarisée au sein du disque imaginal suivie d'un recrutement progressif des ommatidies d'abord par paquets de 5 cellules photoréceptrices (R2, 3, 4, 5 et 8) auxquels s'ajoutent ensuite les 3 photorécepteurs manquants (R1, 6 et 7). Il y a en quelque sorte « cristallisation » progressive des cellules embryonnaires de l'œil.

Les 8 cellules photoréceptrices produisent des axones qui se terminent dans le premier ganglion optique ou lamina pour R1 à R6 et dans le second ou lobula pour R7 et R8. Lamina et lobula ont une organisation propre aussi régulière que celle de l'œil. Cette régularité est-elle intrinsèque ou est-elle déterminée par l'interaction œil-ganglion optique ? Une fois de plus l'emploi de mosaïques génétiques apporte une réponse non ambiguë. Elles ont été constituées à partir de mutants variés dont *glass* ou *rough* chez lesquels l'œil ne forme pas de réseau hexagonal et chez lesquels la lamina est aussi désorganisée (Meyerowitz et Kankel, 1978). On peut obtenir des individus mosaïques chez lesquels une partie des ganglions est irrégulièrement organisée ; elle est toujours sous-jacente à une région de l'œil possédant le phénotype mutant et cela quel que soit son génotype propre. En d'autres termes, le phénotype du ganglion est imposé par le génotype de l'œil et pas l'inverse. A un stade critique du développement les axones des cellules réceptrices interagissent avec les cellules des ganglions optiques et de ce fait en déterminent l'organisation.

La jonction neuromusculaire est, chez les vertébrés, la synapse la mieux connue. Pratiquement impossible à étudier chez la *Drosophile* adulte, elle est d'un accès facile chez la larve (Jan et Jan, 1976-1978). Ses propriétés électrophysiologiques sont très semblables à celles d'une synapse chimique classique et le neurotransmetteur est vraisemblablement le glutamate. Plusieurs mutations affectant la jonction neuromusculaire ont été sélectionnés chez la *Drosophile* et, fait important, leur phénotype s'exprime déjà et peut donc être étudié chez la larve. De l'analyse de Jan et Jan, il résulte que la mutation *shaker* modifie la libération du neurotransmetteur en provoquant une lésion de l'ionophore spécifique pour le  $K^+$  qui intervient dans la propagation du potentiel d'action. La mutation *nap* porterait sur l'ionophore spécifique pour le  $Na^+$ , sensible au potentiel membranaire et bloqué par la

térodotoxine, la mutation *bang sensitive* affecterait l'ATPase  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  dépendante. Si ces interprétations sont confirmées on disposerait donc de mutants sur les trois protéines clefs de la propagation du potentiel d'action.

Enfin, les gènes de structure de deux enzymes impliqués dans le métabolisme de neurotransmetteurs, l'acétylcholinestérase (Hall et Kankel, 1976) et la dopa décarboxylase (Hodgetts, 1975), ont été localisés sur le génome de *Drosophile* par la méthode dite de « l'aneuploïdie segmentaire ». Cette méthode se fonde sur l'observation que le contenu local d'une *Drosophile* adulte, par exemple en acétylcholinestérase, est directement proportionnel au nombre de copies du gène de structure de cet enzyme. On possède des lignées de *Drosophiles* avec des lésions ou des fragments chromosomiques surnuméraires pour pratiquement l'ensemble du génome. De l'analyse de leur contenu en acétylcholinestérase on conclut que le segment 87B-E du chromosome 3 contient le gène de structure de cet enzyme, le segment 36EF-37D du chromosome 2 celui de la dopa décarboxylase.

De l'examen de la littérature récente, il ressort que des premières étapes de la détermination de l'ébauche nerveuse embryonnaire jusqu'à l'organisation fonctionnelle et biochimique de la synapse, le développement du système nerveux de la *Drosophile* est strictement déterminé génétiquement.

La masse de l'ADN du génome des mammifères est environ 28 fois plus élevée que celle de la *Drosophile*. Elle varie peu d'une espèce à l'autre bien que la masse et la complexité du cerveau varient énormément. Chez la souris il y a 20 paires de chromosomes et 5 500 000 neurones, chez l'homme 23 paires de chromosomes et 2 à 16,5 milliards de neurones suivant les estimations. Les deux espèces de mammifères pour lesquelles on possède des données génétiques en nombre important sont précisément l'homme et la souris. L'expérimentation n'est évidemment possible qu'avec la souris, dont le temps de génération est d'environ 8 semaines. L'hétérozygotie est de règle dans les populations naturelles et une analyse génétique n'est faisable que sur des lignées consanguines. Elles ont été établies chez la souris dès 1915-1920. Elles sont en général homozygotes pour au moins 800 gènes. Environ 500 mutations ont été identifiées chez la souris pour environ 250 loci différents ; 140 d'entre elles affectent système nerveux, muscles ou organes des sens (Sidman *et al.*, 1965). Enfin, des mosaïques génétiques peuvent être réalisées chez les mammifères mais suivant un protocole très différent de celui utilisé chez la *Drosophile*. Deux embryons — de constitution génétique différente — sont prélevés au stade 8 cellules, leur enveloppe dissoute par une protéase et les 16 blastomères réaggrégés en un embryon unique qui se trouve donc être tétraparental. Celui-ci est ensuite transféré dans une femelle incubatrice et donne finalement une souris qui peut présenter, par taches, les phénotypes parentaux et de ce fait est appelée *allophène*



(Tarkowski ; Mintz, 1961). Lorsque les embryons sont issus de lignées de couleurs de pelage différentes, par exemple noir et blanc, la souris *allophène* obtenue est zébrée ; chaque tache de pigmentation représente la descendance d'une seule cellule souche — ou clone — de mélanoblaste. On compte que 17 paires de mélanoblastes primordiaux sont à l'origine de l'ensemble de la pigmentation.

Comme chez la *Drosophile*, plusieurs mutations sont connues, bien qu'en beaucoup moins grand nombre, qui affectent le développement embryonnaire précoce et en particulier la lignée ectoblastique d'où dérive le système nerveux. Ce sont par exemple les allèles du locus T. La première mutation de ce locus isolé à l'Institut du Radium par Dobrovolskaia confère le phénotype « queue courte » sous forme hétérozygote et est létal sous forme homozygote. Plusieurs lignées portant des allèles récessifs du locus T ont été isolées à partir de souris sauvages. Sous forme homozygote ces allèles entraînent l'arrêt du développement embryonnaire à des stades variés : formation du blastocyste (t 12), ségrégation de la masse cellulaire interne (to) et de l'ectoderme embryonnaire (tw5), mise en place de la ligne primitive (t9 ou T), invagination du tube neural (tw1), individualisation du cerveau antérieur (tw2). Comme dans le cas des mutations homéotiques, il semble que ces mutations affectent des transitions discrètes entre états différenciés. Le mécanisme précis du blocage de ces transitions n'est pas clair : altération de la surface de certains types cellulaires, mort cellulaire sélective, ou bien les deux, l'une étant la conséquence de l'autre ? Quoiqu'il en soit, cet exemple suffit pour confirmer que les premières étapes du développement de l'œuf des mammifères sont soumises au strict déterminisme d'un programme autonome d'expression génique.

Le cervelet est un centre nerveux qui se prête particulièrement bien à l'analyse génétique. Son organisation fonctionnelle est simple : il est composé d'un petit nombre de types cellulaires répétés un grand nombre de fois : 30 millions de cellules de Purkinje, 200 millions d'interneurones en corbeille ou étoilés, 30 milliards de cellules des grains chez l'homme. Ces neurones sont organisés de manière régulière « quasi cristalline » et tous les types de synapses établies entre ces neurones sont identifiables au microscope électronique. Des méthodes de fractionnement permettent d'isoler les principaux types cellulaires sous forme de suspension homogène ; on peut enregistrer et identifier *in situ* les réponses électrophysiologiques des principales classes de synapses ; de plus, une partie importante de la synaptogenèse dans le cervelet est post-natale et donc d'accès facile. Enfin, chez la souris, 7 mutations affectent sélectivement le développement du cervelet et leur localisation chromosomique est, pour la plupart, connue. Elles affectent aussi bien la forme générale du cervelet et son organisation histologique (*reeler*) que chacun des grands types de neurones : cellules de Purkinje [*nervous* ou *Purkinje cell*

*degeneration* (PCD)], cellules des grains (*weaver*) et même une classe particulière de synapse (*staggerer*).

Chez les souris homozygotes pour la mutation *nervous* (ou *Purkinje cell degeneration*) 90 (ou 99) pour cent des cellules de Purkinje disparaissent entre 20 et 60 jours après la naissance. Des souris *allophènes* ont été construites entre embryons normaux et homozygotes pour la mutation PCD, les cellules de Purkinje ayant un génotype normal se distinguent sur coupe histologique de celles ayant un génotype mutant par leur contenu en  $\beta$ -glucuronidase (moins élevé pour les premières que pour les secondes). On constate que les cellules de Purkinje qui persistent ont toutes un contenu en  $\beta$ -glucuronidase élevé donc que la mutation PCD affecte des propriétés intrinsèques aux cellules de Purkinje et n'a pas d'effet appréciable sur les autres types cellulaires du cervelet. L'emploi de l'un ou l'autre de ces mutants permet d'apprécier la stabilité du réseau mis en place au cours du développement post-natal. Que deviennent les contacts synaptiques établis avec les cellules de Purkinje après la mort de celles-ci. Dégénèrent-ils ou persistent-ils? Sotelo et Triller (1979) ont montré que, 420 jours après la naissance, des fibres parallèles intactes persistent avec leur élément présynaptique complet tandis que la partie post-synaptique a complètement dégénéré. De même les axones des cellules en corbeille forment des corbeilles vides aisément reconnaissables. Une fois mis en place, le réseau nerveux apparaît d'une extrême stabilité.

Le cervelet se développe à partir de neuroépithélium du métencéphale dorsal dès le 14<sup>e</sup> jour de développement fœtal. Entre le 15<sup>e</sup> et le 17<sup>e</sup> jour les cellules de Purkinje se différencient des neurones des noyaux profonds. Une première migration centrifuge amène les cellules de Purkinje près de la surface en leur faisant traverser la région des cellules des noyaux profonds. Puis, du 5<sup>e</sup> au 20<sup>e</sup> jour après la naissance, les cellules des grains, issues d'une ébauche qui leur est propre, prolifèrent au sein d'une couche, externe par rapport aux cellules de Purkinje, dite couche des grains externes. Une deuxième migration centripète fait passer les cellules des grains de la périphérie en profondeur. La traversée de la couche des cellules de Purkinje s'accompagne de la formation de contacts synaptiques entre les axones des cellules des grains (ou fibres parallèles) et l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje.

Le positionnement des cellules de Purkinje dans le cortex cérébelleux est affecté par la mutation *reeler*. La majorité d'entre elles reste mélangée avec les neurones des noyaux profonds. Seules quelques-unes atteignent leur position normale au niveau d'un cortex aminci qui se trouve donc « emboîter » une importante masse cellulaire profonde. Comment la mutation *reeler* affecte-t-elle la mise en place des cellules de Purkinje? Des *allophènes* ont

été réalisées entre embryons normaux et homozygotes *reeler*. On constate que les cellules de Purkinje qui ne migrent pas ont, indifféremment, un contenu en  $\beta$ -glucuronidase élevé ou faible, c'est-à-dire possèdent le génotype normal ou *reeler* (Mullen). La cible primaire de la mutation est donc *extrinsèque* aux cellules de Purkinje. Une hypothèse — non démontrée — est que les cellules gliales interviennent pour guider la migration des cellules de Purkinje et que ce sont elles qui sont touchées par la mutation.

Dès que les cellules de Purkinje atteignent leur position définitive, les arborisations axonales et dendritiques se développent. Peut-on apprécier dans quelle mesure leur forme achevée est déterminée génétiquement? Chez le mutant *reeler* les cellules de Purkinje peuvent se trouver dans des positions variées. On constate que, bien que génotypiquement identiques, ces cellules de Purkinje présentent des arbres dendritiques de forme extrêmement diverses : en parapluie, elliptique... en plus de la forme normale (Sotelo). L'environnement cellulaire, en particulier les cellules des grains, intervient donc dans le développement de la forme finale de l'arborisation dendritique. D'un autre côté, il paraît clair que cette croissance est soumise à une contrainte génétique importante. Chez le mutant *staggerer*, en particulier, les synapses entre fibres parallèles (axone des cellules des grains) et cellules de Purkinje ne se forment pas à la suite d'un déficit propre aux cellules de Purkinje comme le montrent des expériences d'allopénéie. L'analyse quantitative du mode de branchement de l'arbre dendritique permet d'inférer le mode de croissance de cet arbre et de montrer qu'il est touché par la mutation *staggerer*. En d'autres termes, les règles de la croissance dendritique sont déterminées par des facteurs génétiques qui s'expriment de manière intrinsèque dans la cellule de Purkinje, mais l'« interaction » avec un environnement cellulaire adéquat paraît indispensable à l'acquisition de la forme finale.

Dans ces conditions, que se passe-t-il, au niveau synaptique, lorsque la cible d'une terminaison nerveuse en croissance est atteinte par la mutation et, par exemple, manque? Une des voies d'entrée du cervelet est constituée par des fibres moussues qui, normalement, forment des contacts synaptiques avec les cellules des grains. Chez le mutant *weaver* les cellules des grains meurent, en général, avant de migrer et les fibres moussues ne rencontrent pas leur partenaire normal. Elles établissent néanmoins des synapses avec une autre cible disponible : l'arbre dendritique des cellules de Purkinje. La spécificité de « reconnaissance » entre partenaires synaptiques n'est donc pas aussi stricte que le demandent certaines hypothèses couramment admises (Sperry). Ces synapses hétérologues sont fonctionnelles, et semble-t-il, responsables d'un déficit locomoteur, beaucoup plus important que l'absence de cervelet.

Le développement de la jonction neuromusculaire débute par la localisation du récepteur cholinergique et de l'acétylcholinestérase. Ce site une fois

marqué se trouve envahi par plusieurs terminaisons nerveuses dont toutes sauf une régressent ultérieurement. Le même phénomène a lieu dans le cas du développement de l'innervation des cellules de Purkinje par les fibres grimpantes dont l'état final est une seule fibre grimpante par cellule de Purkinje. Chez le mutant *weaver* ou chez le mutant *reeler* au sein de la masse profonde, des cellules de Purkinje se trouvent dans un environnement dépourvu de cellules de grains et n'établissent pas, ou peu, de contacts synaptiques avec les fibres parallèles. Mariani et Crépel ont montré par des méthodes électrophysiologiques que ces cellules conservent jusque chez l'adulte une multi-innervation par plusieurs fibres grimpantes, qui disparaît à un stade tardif du développement chez l'individu normal. En d'autres termes, la stabilisation sélective d'une fibre grimpante par cellule de Purkinje se trouve modifiée, vraisemblablement de manière indirecte, à la suite de la mutation.

En conclusion, les études sur le cervelet montrent sans ambiguïté que la différenciation et la survie des principales catégories de neurones, leur mise en place par migration, les règles de croissance et de stabilisation de leurs prolongements axoniques et dendritiques, sont très largement déterminées génétiquement.

Le système visuel est plus complexe que le cervelet puisqu'il met en œuvre simultanément plusieurs centres nerveux chacun avec son organisation propre. Il a néanmoins fait l'objet d'une analyse génétique poussée. Chase a décrit en 1945 une mutation récessive *eyeless* qui, sous forme homozygote, entraîne chez la souris l'absence d'œil ou divers degrés de microphthalmie. L'œil chez les vertébrés, et la souris en particulier, se développe à partir de deux ébauches embryonnaires distinctes : une évagination du tube neural qui induit une invagination de l'ectoderme. La première donne la rétine, la seconde le cristallin. Dans les conditions normales, une couche de cellules mésenchymateuses sépare les deux ébauches. Aux premières étapes du développement de l'œil ces cellules meurent. Chez le mutant *eyeless* cette mort n'a pas lieu et le développement de l'œil s'arrête, sans doute à la suite d'un blocage de l'induction du cristallin par l'ébauche nerveuse. La mort d'un type particulier de cellule constitue donc une étape critique de la morphogénèse de l'œil et se trouve déterminée par un (ou des) gène(s) précis.

La rétine est composée de trois grandes classes de cellules : les cellules réceptrices (cônes et bâtonnets), diverses catégories de neurones et les cellules pigmentées. Certaines mutations, comme *albinos*, interfèrent avec la formation de pigment en altérant la structure de la tyrosinase, enzyme clef dans la synthèse de mélanine. Chez la souris, la mutation *retinal degeneration*, sous sa forme homozygote, entraîne, dix jours après la naissance, la mort des bâtonnets alors que les cônes persistent. Mintz et Sanyal (1975) ont construit

des souris allophènes avec des embryons homozygotes pour *retinal degeneration* et aussi avec des embryons *albinos*. Dans le premier cas, on observe des secteurs radiaux marqués par la dégénérescence des bâtonnets et chaque secteur représente un clone. Ces secteurs ne se superposent pas à ceux marqués par l'absence de pigment. On compte dix secteurs de chaque sorte. La rétine se développe donc à partir de vingt cellules primordiales dont la moitié donne les cellules pigmentaires, et l'autre moitié la rétine sensible. Ces expériences montrent l'indépendance de la détermination et du développement des cellules pigmentaires et des cellules réceptrices. Mais d'autres expériences indiquent qu'une interaction entre celles-ci est indispensable au développement normal et à la survie des bâtonnets. Chez le rat la mutation *retinal dystrophy* s'accompagne d'une dégénérescence à la fois des cellules pigmentaires et des bâtonnets. L'observation de la rétine de rats allophènes montre que les taches de dégénérescence des bâtonnets se superposent exactement à celles de la dégénérescence de la couche pigmentaire. Il semble que la mutation affecte directement le pouvoir de phagocytose de la cellule pigmentaire qui, en digérant l'extrémité du bâtonnet, assure le maintien de sa croissance et par là sa survie.

La mutation *albinos* affecte strictement la pigmentation de la rétine. Cependant, en observant des sections de cerveau de chat siamois, Guillery découvre une anomalie remarquable de la topologie des voies visuelles chez ce mutant albinos thermosensible. Le corps genouillé latéral où se projettent les axones des cellules ganglionnaires de la rétine est normalement composé de deux couches cellulaires parallèles. Dans la couche A se terminent les axones issus de la rétine contra-latérale, dans la couche A<sub>1</sub>, sous-jacente, les terminaisons ipsi-latérales. Chez le chat siamois la couche A<sub>1</sub> apparaît anatomiquement fragmentée du fait du remplacement d'un paquet de projections ipsi-latérales par des projections contra-latérales. Les données électrophysiologiques confirment les observations anatomiques.

Qu'advient-il des projections des neurones du corps genouillé sur le cortex visuel ? Normalement les deux couches du corps genouillé envoient des axones qui convergent sur la même aire du cortex et cette convergence est à l'origine de la vision binoculaire. Chez le chat siamois cela ne peut avoir lieu normalement. Deux solutions se trouvent employées pour surmonter cette difficulté. Chez les chats siamois du Middle West les signaux aberrants ne sont pas reçus au niveau cérébral, un « censeur cérébral » les supprime. Chez les chats siamois de la région de Boston une réorganisation des connections conduit à un « redressement » de leurs projections corticales. La raison pour laquelle une mutation de pigmentation entraîne une telle aberration des voies visuelles n'est pas claire. Certes elle est générale car le phénomène se retrouve chez la souris, le rat, le furet et même le tigre. Elle ne semble pas liée à la tyrosinase proprement dite mais à l'absence de pigmentation. Chez le vison en effet,

des mutations de dépigmentation, distinctes de la mutation albinos et n'affectant pas la tyrosinase, entraînent une déviation des axones des cellules ganglionnaires à un stade très précoce du développement de la rétine, au moment où se décide le choix de leur projection sur le corps genouillé ipsilatéral ou contra-latéral.

La mutation *reeler* est une des rares mutations qui affecte à la fois le cervelet et une autre région du cerveau, en l'occurrence le cortex cérébral. Chez l'homozygote l'organisation laminaire du cortex cérébral est inversée à la suite d'une anomalie de migration des diverses catégories de neurones. Les couches normalement en profondeur s'observent en surface. Les enregistrements électrophysiologiques effectués par Dräger dans le cortex visuel indiquent cependant que les projections des champs visuels et les principales réponses sont conservées ainsi que les principales connections anatomiques. Une réorganisation a lieu qui rétablit une connectivité normale en dépit d'une inversion complète de la topologie neuronale. Les mécanismes qui assurent cette réorganisation « adaptative » ne sont pas connus.

L'activité du système nerveux se manifeste, *in fine*, par une action de l'organisme sur son environnement que l'on convient d'appeler « comportement ». Le plus souvent un comportement en apparence simple engage un nombre important de neurones, mais s'il est quantifiable, il peut faire l'objet d'une analyse génétique.

C'est le cas par exemple du chant du grillon. Le chant « d'appel » produit par les mâles sert à attirer et surtout guider la femelle vers le terrier du chanteur. Il peut être enregistré sous forme d'un sonogramme où la fréquence du son est inscrite en fonction du temps. Le chant du *Teleogryllus oceanicus* est composé de phrases toutes identiques entre elles qui débutent par un cri de 5 impulsions suivi de 10 trilles de 2 impulsions. Le chant est produit par le mouvement des élytres qui entraîne le frottement d'un « archet » de l'une des élytres sur une « corde » de l'autre. Ce mouvement est commandé par des muscles d'ouverture et de fermeture qui se contractent lorsqu'un influx nerveux arrive par le nerf moteur. Chaque potentiel d'action du nerf moteur détermine une impulsion sonore et la séquence sonore du chant est identique à la séquence d'influx nerveux produite par le neurone moteur. Les deux premiers ganglions thoraciques contiennent l'ensemble des neurones moteurs responsables du chant (environ 1 000) que l'on peut d'ailleurs identifier individuellement par marquage intracellulaire. Ces neurones se répartissent en deux groupes « d'ouverture » et de « fermeture » des ailes. Au sein d'un groupe particulier les neurones font l'objet d'un couplage, vraisemblablement de type électrique, et l'activité d'un groupe inhibe celle de l'autre. Les neurones moteurs sont, eux-mêmes, commandés par des

interneurones présents dans les ganglions cérébroïdes qui constituent « l'oscillateur » responsable de la « structure » du chant (Huber ; Bentley et Horg).

Le chant n'est produit que par l'adulte une semaine après la dernière mue. La nymphe au stade précédent possède des moignons d'ailes qui, bien que mobiles, ne produisent pas les mouvements caractéristiques du chant. Ceux-ci peuvent être provoqués par une lésion sélective des ganglions cérébroïdes. Le réseau nerveux responsable du chant s'assemble donc de manière autonome, en l'absence de rétroaction acoustique, et son activité est inhibée, avant le stade adulte, par des neurones cérébraux.

Elevé dans des environnements sonores variés, le grillon mâle produit toujours le même chant d'appel. Son chant est inné. L'analyse génétique du chant a été rendue possible du fait que deux espèces produisant des chants très différents : *T. oceanicus* et *T. commodus* sont interfécondes. L'hybride de première génération produit un chant « hybride » : l'intervalle entre trilles ressemble à celui de l'espèce qui a servi comme parent maternel. Le déterminisme est polygénique avec évidemment au moins un gène sur le chromosome X. La réceptivité de la femelle peut, elle aussi, être étudiée de manière quantitative. La femelle est suspendue de manière rigide à une tige métallique et tient entre ses pattes, une sphère en mousse de plastique. En remuant ses pattes elle fait tourner la balle de plastique. Cette sphère est découpée en double Y, de telle sorte que la femelle en faisant tourner la boule se trouve affrontée à un choix droite-gauche. Un haut parleur, situé alternativement à droite ou à gauche de l'animal émet un chant. On compte le nombre de choix vers une direction donnée par rapport au nombre de tours de la balle. Il est aisé de montrer par cette méthode que la femelle d'une espèce donnée n'est réceptive qu'au chant du mâle de cette espèce. D'autre part, fait remarquable, la femelle hybride de première génération est plus sensible au chant du mâle hybride qu'à celui des parents. Il existe donc un déterminisme génétique de la réceptivité de la femelle très voisin de celui de l'émission du chant chez le mâle.

Le croisement en retour de l'hybride de première génération avec le parent *T. oceanicus* produit un individu dont le chant ressemble beaucoup à celui du parent sauf que les trilles sont à trois notes au lieu d'être à deux notes. Si, chez le parent, on accroît la fréquence de stimulations des neurones moteurs par les interneurones cérébraux de + 10 %, le nombre d'impulsions par trille passe de deux à trois. Le déterminisme génétique peut donc porter sur une réponse aussi fine qu'un changement d'activité spontanée de 10 % dans un interneurone de commande du cerveau.

L'analyse génétique de comportements intégrés chez les vertébrés ne fait que débiter — mais quelques exemples sont bien documentés. C'est le cas du comportement d'auto-stimulation chez la souris (Cazala et Guénet). La

souris a la possibilité, en introduisant son museau dans une cellule photo-électrique, d'envoyer une impulsion électrique dans une électrode implantée dans son hypothalamus latéral. Une auto-stimulation se développe à des fréquences qui varient d'une lignée congénique à l'autre. L'analyse de la descendance de parents ayant des caractères d'auto-stimulation différents montre que le phénotype auto-stimulation à faible fréquence est dominant et déterminé par un gène principal.

De même, chez la souris, la durée des ondes lentes du sommeil et celle du sommeil paradoxal différent d'une lignée à l'autre et sont transmissibles comme des caractères mendéliens.

Le chant est, chez beaucoup d'oiseaux, inné comme celui du grillon. C'est le cas du chant de la poule ou du coq qui, élevés dès l'œuf en isolement sonore complet, ou assourdis par destruction des oreilles produisent, comme le grillon, toujours le même chant. Le pinson se situe à l'autre extrême. Son chant est très réduit si on l'élève en isolement sonore. S'il est assourdi à la naissance, son chant ressemble au cri des oisillons encore au nid. Il y a à la fois nécessité d'une rétroaction auditive et apprentissage. Le cas du moineau *Melospiza melodia* est intermédiaire puisqu'il produit un chant normal lorsqu'il est élevé en isolement sensoriel complet, mais pas lorsqu'il est rendu sourd.

L'exemple du chant des oiseaux montre que la « structure » du chant d'une espèce donnée est très largement pré-programmée donc produite par des influx nerveux circulant dans un réseau nerveux pré-établi comme dans le cas du grillon. Il existe toutefois chez certaines espèces des possibilités de variation associées à l'expérience, mais évidemment, dans des limites restreintes. L'analyse de ce type de variabilité phénotypique fera l'objet du cours de l'année prochaine.

J.-P. C.

## SÉMINAIRES

### *Mécanisme de libération des neurotransmetteurs*

R. COUTEAUX : Données ultrastructurales et cytochimiques sur le mécanisme de la libération de l'acétylcholine.

P. BENOIT : Libération quantique et non quantique à la jonction neuro-musculaire.

M. ISRAEL : Le mécanisme de libération de l'acétylcholine et sa régulation.



N. MOREL : Terminaisons nerveuses cholinergiques isolées : métabolisme et libération du médiateur.

C. BON : Les neurotoxines à l'action présynaptique.

J.P. HENRY : Les structures de stockage de catécholamines de la médullo-surrénale.

C. KORDON : Résultats récents sur la libération des neuropeptides *in vitro*.

J. GLOWINSKI : Contrôles présynaptiques de la libération des catécholamines.

S.Z. LANGER : Récepteurs présynaptiques modulant la libération des neurotransmetteurs.

COMPTE RENDU D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE DE COMMUNICATIONS CELLULAIRES  
ANNÉE 1978

Durant l'année 1978, l'activité de l'équipe du laboratoire de Communications cellulaires (J.P. Changeux) a été centrée, comme par le passé, autour de deux thèmes principaux : 1) les propriétés structurales et fonctionnelles de la protéine réceptrice de l'acétylcholine de l'organe électrique de Torpille et 2) le développement de la synapse 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) *PROTÉINE RÉCEPTRICE DE L'ACÉTYLCHOLINE*

1) *Structure du régulateur (récepteur + ionophore) cholinergique*

Les fragments de membrane sous-synaptique très purifiés préparés à partir de l'organe électrique de Torpille donnent par électrophorèse dénaturante en SDS deux bandes principales de masse moléculaire apparente 40 000 et 43 000 dalton ainsi que des bandes mineures de masse moléculaire apparente 50 000, 66 000 et 100 000 dalton. Seule la signification de la bande de 40 000 dalton est claire : elle réagit avec un marqueur d'affinité covalent ( $^3\text{H}$  MPTA) hautement spécifique du site actif du récepteur. Les autres bandes font-elles partie du régulateur ?

Après dissolution des fragments de membrane par un détergent *non dénaturant* l'extrait brut est filtré sur Sépharose, la composition en bande de chaque fraction est ensuite révélée par électrophorèse *dénaturante* après

coloration par le bleu de Coomassie. On constate que chacune des quatre bandes observées suit un profil d'éluion différent et fait donc partie d'unités macromoléculaires distinctes. Dans ces conditions, la protéine réceptrice, *sensu stricto*, ne serait composée que par des chaînes de 40 000 dalton, les autres ne représenteraient que des « contaminants ». Cette interprétation se trouve renforcée par l'analyse des acides aminés N-terminaux qui ne révèle que la L-sérine. La forme 9 S de la protéine réceptrice de masse moléculaire 250 000 dalton devrait donc être un hexamère. Cette structure doit être confirmée car une susceptibilité particulière de certaines bandes à la protéolyse n'est pas exclue.

Un peptide marqué au  $^3\text{H}$  MPTA a été purifié après découpage de la protéine réceptrice purifiée par le bromure de cyanogène ; sa séquence débute par  $\text{NH}^2\text{-Met-Lys-Gly}$ ...

La protéine 43 K qui se sépare de la protéine réceptrice *sensu stricto* après dissolution par un détergent non dénaturant diffère de l'actine (de bœuf ou de Torpille) et n'a pas de réaction immunologique croisée avec la protéine réceptrice. C'est une protéine entièrement différente.

#### 2) *Caractérisation du site de liaison des anesthésiques locaux de l'histrionicotoxine*

Les anesthésiques locaux et l'histrionicotoxine bloquent le changement de perméabilité provoqué par l'acétylcholine à un site, distinct du site récepteur, mais qui est en relation, directe ou indirecte, avec l'ionophore. L'interaction d'un anesthésique local fluorescent, la quinacrine, avec ces sites s'accompagne d'un accroissement d'intensité de fluorescence qui est amplifié par la carbamylcholine et aboli par une toxine de grenouille, l'histrionicotoxine. De même, la liaison sur ces sites d'un anesthésique local radioactif, le triméthisoquin, est augmentée par la carbamylcholine. Le ( $^3\text{H}$ )-triméthisoquin est déplacé de ses sites spécifiques par les anesthésiques locaux, l'histrionicotoxine et les détergents dans le domaine de concentration où ils sont actifs pharmacologiquement. Le nombre de ces sites est voisin ou inférieur (1/2) à celui des sites d' $\alpha$ -toxine.

La protéine 43 K, en l'absence de détergent, lie la quinacrine et les anesthésiques locaux mais de manière non spécifique. Neubig et *al.* (1979) ont en effet montré qu'un traitement à pH 11 de membranes riches en récepteur sépare la protéine 43 K, qui passe en solution, mais conserve la liaison d'anesthésique local sur les membranes qui ne contiennent plus que les peptides caractéristiques du récepteur. Le site de liaison des anesthésiques locaux et de l'histrionicotoxine doit donc être porté par l'un de ces peptides.

3) *Cinétique rapide d'interaction d'un agoniste fluorescent avec le récepteur cholinergique sous forme membranaire*

L'analyse quantitative de l'interaction d'un agoniste fluorescent dansylé ( $C_5$ DACHol) avec les fragments de membrane riches en récepteur conduit à la distinction de trois étapes cinétiques, dans les domaines de temps de la milliseconde à la seconde. La cinétique « rapide » résulte de l'interaction du  $C_5$ DACHol avec des sites dans un état de haute affinité, la « moyenne » avec des sites de faible affinité et la « lente » à l'interconversion entre états de faible et haute affinité. Les anesthésiques locaux accélèrent la désensibilisation de la réponse de perméabilité, ils accélèrent aussi la cinétique « lente » enregistrée avec le  $C_5$ DACHol. Une relation de cause à effet semble donc exister entre ces deux processus qui s'effectuent dans le même domaine de temps. Les anesthésiques locaux accélèrent aussi le processus « intermédiaire » ce qui suggère que ce processus inclut, en plus d'une réaction de liaison, une étape d'isomérisation vers un troisième état. Cet état sur lequel se lient aussi les anesthésiques locaux correspondrait à l'état « actif » du régulateur cholinergique.

Il devient donc possible d'analyser quantitativement les transitions structurales responsables de l'« activation » et de la « désensibilisation ».

4) *Reconstitution de l'interaction allostérique entre site récepteur et site de liaison des anesthésiques locaux*

Afin de comprendre le rôle de la protéine 43 K des expériences de « reconstitution » de l'interaction allostérique agoniste-anesthésiques locaux ont été entreprises après dissolution des fragments de membrane natifs par le cholate de sodium. En présence de cholate, l'effet des anesthésiques locaux sur la liaison de  $C_5$ DACHol est perdue et la protéine réceptrice se trouve stabilisée en solution dans un état d'affinité « intermédiaire » pour le  $C_5$ DACHol. L'élimination du détergent par dilution permet de récupérer à la fois les trois processus cinétiques normaux de l'interaction du  $C_5$ DACHol et l'effet des anesthésiques locaux sur ces cinétiques.

La même expérience effectuée avec des microsacs traités à pH 11 qui ne contiennent pas la protéine 43 K donne les mêmes résultats. Ceci confirme que la protéine 43 K n'est pas impliquée dans les interactions allostériques entre site récepteur et site de liaison des anesthésiques locaux.

5) *Phosphorylation du récepteur cholinergique de Torpille*

Les fragments de membrane riches en récepteur de Torpille contiennent une kinase qui phosphoryle plusieurs protéines membranaires en présence d'ATP $\gamma^{32}P$  et de cations divalents. Dans ces conditions, la chaîne 40 K

n'est pas phosphorylée mais la 43 K l'est. Les ions  $K^+$ , à une concentration supérieure à 150 mM, accroissent sélectivement la phosphorylation de la chaîne 43 K. D'autre part, les ions  $Na^+$  à une concentration aussi faible que 30 mM inhibent de manière sélective la phosphorylation de tous les peptides susceptibles de phosphorylation sauf celle de la chaîne 93 K qui, au contraire, s'accroît aux concentrations élevées de  $Na^+$ .

## B) DÉVELOPPEMENT SYNAPTIQUE

### 1) Métabolisme du récepteur cholinergique au cours du développement de la jonction neuromusculaire

Le métabolisme du récepteur cholinergique a été comparé dans deux muscles du poulet qui possèdent des modes d'innervation différents. L'un, ALD, reçoit plusieurs terminaisons nerveuses fonctionnelles équidistantes le long de la fibre musculaire, l'autre, PLD, n'est innervé qu'en un point situé au milieu de la fibre. Dans le PLD le contenu total augmente puis diminue après le 14<sup>e</sup> jour de vie embryonnaire du fait de l'arrêt de la synthèse de récepteur extra-synaptique suivie de la disparition de celui-ci par dégradation spontanée.

Dans l'ALD, l'évolution du contenu total en récepteur est différente. Aucune diminution n'est observée. Très vraisemblablement, une importante synthèse de récepteur sous-synaptique a lieu dans ce muscle multiinnervé au moment où le récepteur extra-synaptique disparaît.

Le blocage chronique de l'activité neuromusculaire de l'embryon entraîne une disparition de l'acétylcholinestérase que révèle, au niveau de la jonction nerf-muscle, la réaction de Koelle. Du même coup, la forme lourde 16 S de l'acétylcholinestérase disparaît. Le même blocage ralentit la chute du contenu total en récepteur du PLD qui a lieu après le 14<sup>e</sup> jour en maintenant un taux de synthèse élevé. Des expériences *in vitro* indiquent que, dans les myotubes d'embryon de poulet cultivés *in vitro* les nucléotides cycliques sont impliqués comme signaux de couplage entre l'activité électrique de la fibre musculaire et l'arrêt de la synthèse de récepteur.

### 2) Cervelet

• *Protéine P 400* : Des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine P 400 (caractéristique des cellules de Purkinje) ont été obtenus. La réaction d'immunofluorescence indirecte sur tranche fine de cervelet de souris, a permis de montrer que l'antigène est abondant sur les dendrites et soma des cellules de Purkinje et absent des neurones des noyaux profonds du cervelet.

• *Immunologie des cellules de Purkinje* : Des anticorps dirigés contre les cellules de Purkinje de rat ont été obtenus chez le lapin. La spécificité de ces anticorps a été mise à l'épreuve en utilisant le mutant de souris *Purkinje cell degeneration* (pcd) chez qui 99 % des cellules de Purkinje disparaissent du cervelet un mois après la naissance. La liaison des  $^{125}\text{I}$ -IGG enrichies en anticorps anti-cellules de Purkinje a été comparée sur des préparations de membranes de cervelet de souris normale et pcd/pcd.

*Avant* épuisement une différence faible mais significative est déjà apparente. *Après* épuisement sur des membranes de foie et de cœur cette différence s'accroît très nettement : environ 17 % des anticorps ne se lient pas aux membranes de cervelet pcd/pcd. Enfin, après absorption sur des membranes de cerveau, ce pourcentage augmente jusqu'à 75 %. Ces résultats indiquent sans ambiguïté qu'une fraction importante des anticorps anti-cellules de Purkinje est dirigée spécifiquement contre cette classe de cellule. La méthode d'immunofluorescence permet de localiser les antigènes concernés au niveau des cellules de Purkinje et de leur arborisation dendritique.

#### LISTE DES PUBLICATIONS PARUES EN 1978-1979

J.P. BOURGEOIS, J.L. POPOT, A. RYTER et J.P. CHANGEUX, *Quantitative studies on the localization of the cholinergic receptor protein in the normal and denervated electroplaque from Electrophorus electricus* (*J. Cell Biol.*, 79, 200-216, 1978).

J.P. BOURGEOIS, H. BETZ et J.P. CHANGEUX, *Effets de la paralysie chronique de l'embryon de poulet par le flaxédil sur le développement de la jonction neuromusculaire* (*C.R. Acad. Sci. Paris*, 286 D, 773-776, 1978).

T. HEIDMANN, A. SOBEL et J.P. CHANGEUX, *Recovery of allosteric interactions between a fluorescent cholinergic agonist and local anesthetics after removal of the detergent from cholate solubilized membrane fragments rich in acetylcholine receptor* (*FEBS Lett.*, 94 (2), 397-404, 1978).

J.P. CHANGEUX et K. MIKOSHIBA, *Genetic and « epigenetic » factors regulating synapse formation in vertebrate cerebellum and neuromuscular junction*. In « *Maturation of the nervous system* » (*Progress in Brain Research*), 48 (ed. M.A. Corner et al.), 43-64 (1978).

C. BON, *The nicotinic cholinergic receptor*. In « *Membrane cell regulation* » (ed. P. Guerrier et M. Moreau) (*Biologie cellulaire*), 32, 3-6 (1978).

O.S. JORGENSEN et K. MIKOSHIBA, *The brain-specific proteins D1, D2 and D3 in the cerebellum of staggerer, reeler and weaver mutant mice* (FEBS Lett., 93 (2), 185-188, 1978).

A. SOBEL, J. HOFER, T. HEIDMANN et J.P. CHANGEUX, *Structural and functional properties of the acetylcholine-regulator*. In « *Advances in pharmacology and therapeutics* », vol. 1, Receptors (ed. J. Jacob), Pergamon press Oxford et New York (1978), pp. 99-105.

J.P. CHANGEUX, *Claude Bernard's experiments on the mode of action of curare and the modern views on synaptic transmission at the motor endplate* (Stanford Symposium, sous presse, 1979).

C. BON, J.P. CHANGEUX, T.W. JENG et H. FRAENKEL-CONRAT, *Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits* (Eur. J. Biochem., sous presse, 1979).

C. BON et T.W. JENG, *Crotoxin ; a possible mechanism of action* (In « *Advances in cytopharmacology*, vol. 3. Neurotoxins : tools in neurobiology ») (B. Ceccarelli and F. Clementi, Eds.), Raven Press, pp. 231-235 (1979).

T. HEIDMANN et J.P. CHANGEUX, *Fast kinetic studies on the interaction of a fluorescent agonist with the membrane-bound acetylcholine receptor from T. marmorata* (Eur. J. Biochem., 94, 255-279, 1979).

T. HEIDMANN et J.P. CHANGEUX, *Fast kinetic studies on the allosteric interactions between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites* (Eur. J. Biochem., 94, 281-296, 1979).

H. BETZ et J.P. CHANGEUX, *Regulation of muscle acetylcholine receptor synthesis in vitro by derivatives of cyclic nucleotides* (Nature, 278, 749-752, 1979).

J.P. CHANGEUX, *La Neurobiologie : désormais une science à part entière* (La Recherche, n° 100, 529-530, mai 1979).

J.P. CHANGEUX, A. Ph. D. with Jacques Monod : *prehistory of allosteric proteins*. In « *Origins of molecular biology : a tribute to Jacques Monod* » (A. Lwoff et A. Ullmann, ed.), (Academic Press New York, 191-202- 1979.)

J.P. CHANGEUX, *Some principles of neuronal regulation at the postsynaptic level*. In « *Central regulation of the endocrine system* » (K. Fuxe, T. Hökfelt et R. Luft, ed.) (Plenum press New York, 489-505, Nobel Foundation Symposium, 1979.)

J.P. CHANGEUX, T. HEIDMANN, J.L. POPOT et A. SOBEL, *Reconstitution of a functional acetylcholine regulator under defined conditions* (F.E.B.S. Lett., 105, 181-187, 1979).

A. DEVILLERS-THIERY, J.P. CHANGEUX, P. PAROUTAUD et A.D. STROSBURG, *The amino-terminal sequence of the 40 K subunit of the acetylcholine receptor protein from Torpedo marmorata* (F.E.B.S. Lett., 104, 99-105, 1979).

J.P. CHANGEUX, *L'Homme neuronal. Entretien avec Jean Bergès, Alain Grosrichard, Eric Laurent et Jacques-Alain Miller*. In *ORNICAR?* n° 17, 18, 137-174 (1979).

J. MALLET, R. CHRISTEN et J.P. CHANGEUX, *Immunological studies of the Purkinje cells from rat and mouse cerebella. I. Evidence for antibodies characteristic of the Purkinje cells* (Develop. Biol., sous presse, 1979).

P.L. WOODHAMS, J. MALLET, J.P. CHANGEUX et R. BALAZS, *Immunological studies on the Purkinje cells from rat and mouse cerebella. II. Immunohistochemical specificity of the antiserum to Purkinje cells* (Develop. Biol., sous presse, 1979).

H. BETZ, J.P. BOURGEOIS et J.P. CHANGEUX, *Evolution of cholinergic proteins in developing slow and fast skeletal muscles from chick embryo* (J. Physiol., submitted, 1979).

K. MIKOSHIBA, M. HUCHET et J.P. CHANGEUX, *Biochemical and immunological studies on the P 400 protein, a protein characteristic of the Purkinje cell from mouse and rat cerebellum* (Dev. Neurosciences, sous presse, 1979).

G. MARLAS et C. BON, *Relationship between the pharmacological postsynaptic effect of crotoxin and its phospholipase activity* (Eur. J. Biochem., soumis, 1979).

J.P. CHANGEUX, *Les expériences de Claude Bernard sur le curare et les données actuelles sur la transmission synaptique cholinergique* (Symp. Claude Bernard, Paris, sous presse, 1979).

J.P. CHANGEUX, *Déterminisme génétique et épigénèse des réseaux de neurones : existe-t-il un compromis biologique possible entre Chomsky et Piaget ?* (Centre Royaumont pour une Science de l'Homme, sous presse, 1979).

J. MARIANI et J.P. CHANGEUX, *Multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the cerebellum of the adult staggerer mutant mouse* (J. Neurobiol., sous presse, 1979).

M. TOUTANT, J.P. BOURGEOIS, J.P. TOUTANT, D. RENAUD, G. LE DOUARIN et J.P. CHANGEUX, *Chronic stimulation of the spinal cord in developing chick embryo causes the differentiation of multiple clusters of acetylcholine receptor in the posterior Latissimus dorsi muscle* (Develop. Biol., soumis, 1979).

J. MARIANI, B. MATON et S. BOUISSET, *Force gradation and motor unit activity during voluntary movements in man (EEG and Clinical Neurophysiol., sous presse, 1979).*

J. MARIANI, *Electrophysiological study of inferior olivary neurons in staggerer mutant mice (Exp. Brain Research, soumis, 1979).*

T. SAITOH et J.P. CHANGEUX, *In vitro phosphorylation of acetylcholine-receptor-rich membranes from Torpedo marmorata : effect on membrane solubilization by detergents (Eur. J. Biochem., soumis, 1979).*

CONFÉRENCES DONNÉES SUR INVITATION  
A DES CONGRÈS, COLLOQUES  
ET SYMPOSIUM INTERNATIONAUX

Jean-Pierre CHANGEUX :

- Course on Molecular Neurobiology - University of California, Riverside (U.S.A.), janvier-février 1978.
- Meeting Claude Bernard - Stanford University (U.S.A.), février 1978.
- Fourth EMBO Annual Symposium - Heidelberg (R.F.A.), mai 1978.
- Symposium Université de Saarlandes - Hombourg (R.F.A.), mai 1978.
- Francqui Colloquium on Differentiation - Université de Bruxelles (Belgique), juin 1978.
- 12th FEBS Meeting - Dresde (R.D.A.), juillet 1978.
- Third International Symposium on Cytopharmacology - Venise (Italie), juillet 1978.
- 7<sup>e</sup> Congrès International de Pharmacologie - Paris (France), juillet 1978.
- V<sup>th</sup> Colloquium of the Federation of European Connective Tissue Clubs - Faculté de Médecine, Créteil (France), août 1978.
- II European Neurosciences Meeting - Florence (Italie), septembre 1978.
- International Symposium Development and Chemical Specificity of Neurons - EMBO and 8<sup>th</sup> International Neurobiology Society Meeting - DAVOS (Suisse), septembre 1978.
- 34th Stated Neurosciences Research Program Meeting - Boston (U.S.A.), octobre 1978.
- Workshop on Physical Chemical Aspects of Cell Surface Events in Cellular Regulation - Bethesda (U.S.A.), octobre 1978.
- John Krantz Memorial Lecture - Baltimore (U.S.A.), octobre 1978.



- International Congress of Inflammation - Bologne (Italie), octobre 1978.
- The Gairdner Foundation's Award - Toronto (Canada), novembre 1978.
- Conférences INSERM - Developmental Neurobiology - Seillac (France), novembre 1978.
- Colloque Claude Bernard - Paris (France), décembre 1978.

Heinrich BETZ :

- Fourth EMBO Annual Symposium - Heidelberg (R.F.A.), mai 1978.
- Biozentrum - Université de Bâle (Suisse), mai 1978.
- II European Neurosciences Meeting - Florence (Italie), septembre 1978.
- « The Plasma Membrane in Differentiation and Cancer » - Saint-Vincent (Italie), octobre 1978.
- Conférences INSERM - Developmental Neurobiology - Seillac (France), novembre 1978.

Anne DEVILLERS-THIERY :

- Colloque sur la conformation des protéines - Roscoff (France), mai 1978.

Jean-Luc POPOT :

- Symposium « The cholinergic synapse » - Zinkovy (Tchécoslovaquie), mai 1978.
- II European Neurosciences Meeting - Florence (Italie), septembre 1978.
- Mini Conference on Membrane Protein - Constance (R.F.A.), septembre 1978.

André SOBEL :

- II European Neurosciences Meeting - Florence (Italie), septembre 1978.

DISTINCTION

- The Gairdner Foundation's Award - Toronto (Canada), novembre 1978.