

## Communications cellulaires

M. Jean-Pierre CHANGEUX, professeur

Le cours de cette année intitulé « Effets de l'interaction avec l'environnement sur le développement de l'organisation fonctionnelle du système nerveux » fait partie d'un ensemble de réflexions dont le propos est de comparer la complexité du système nerveux central de l'adulte à celle du génome, et cela, afin d'essayer de comprendre comment cette complexité se construit à partir de l'œuf et ses  $2n$  chromosomes. Bien que le nombre de cellules nerveuses ne représente qu'un indicateur médiocre du niveau de complexité, rappelons que la *Drosophile*, avec  $0.24 \times 10^{-6}$   $\mu\text{g}$  d'ADN par noyau (24 fois le chromosome du *Colibacille*), possède un système nerveux d'environ 100 000 neurones. Le contenu en ADN de l'œuf fécondé de souris est 27 fois plus élevé que celui de la *Drosophile* mais son cerveau est près de 60 fois plus riche en cellules nerveuses. L'Homme, enfin, avec ses 2 à 16,5 milliards de neurones, a un génome qui, en masse d'ADN, ne diffère pas sensiblement de celui de la souris. La complexité du système nerveux central paraît donc évoluer de manière *non-linéaire* avec celle du génome. Les origines évolutives du cerveau humain illustrent ce paradoxe de manière exemplaire.

Le poids du cerveau est le paramètre le plus simple qui permette d'apprécier l'évolution anatomique du système nerveux. Toutefois, la comparaison des poids *absolus* est contestable ; on cite le cas du rorqual bleu ou de l'éléphant d'Afrique dont les cerveaux pèsent respectivement 6 800 g ou 5 700 g alors que celui de l'homme ne pèse, en moyenne, que 1 350 g ; d'où la nécessité de tenir compte du poids du corps. Au sein d'un même groupe zoologique (insectivores, carnivores, simiens), le poids de l'encéphale  $E$  est relié à celui du corps  $P$  par la loi  $E = k \times P^{2/3}$  (Snell, 1892). Cette relation suggère que la masse de l'encéphale est proportionnelle à la surface plutôt qu'à la masse du corps. Dans ces conditions,  $k$  devient un « indice d'encéphalisation ». Il correspond au poids encéphalique de l'espèce quand son poids somatique est pris pour unité. Cet indice s'accroît des reptiles, aux oiseaux puis aux mammifères. Il progresse de manière spectaculaire des mammifères primi-

tifs, comme les insectivores, à l'homme. Les prosimiens, le gorille, l'orang-outan, le chimpanzé, l'homme ont des indices d'encéphalisation respectivement 3,9, 6,7, 8,9, 11,3 et 28,8 fois plus élevés que celui des « insectivores de base » pris comme référence (Bauchot et Stéphan, 1969). Toutefois, des valeurs comparables à celles du chimpanzé sont atteintes dans des groupes zoologiques qui ne se trouvent pas sur la lignée directe de l'homme (phoques, dauphins). La mesure du poids du cerveau est trop globale pour permettre d'évaluer, à elle seule, l'accroissement de complexité du cerveau.

La forme extérieure de l'encéphale, aussi, change. Le nombre de circonvolutions cérébrales, donc la surface du cortex, s'accroît des singes primitifs à l'homme. La mesure comparée du volume des diverses parties de l'encéphale indique une évolution différentielle de celles-ci. Par exemple, dans la série Prosimiens, Gorille, Chimpanzé, Homme, le *néocortex* s'accroît, en volume, 8, 20, 58 et 156 fois par rapport à celui de l'insectivore de base ; dans la même série, des accroissements de 2, 1,3, 1,8 et 4,2 fois seulement sont trouvés pour le volume de l'*hippocampe* ; enfin, des coefficients de 0,66, 0,04, 0,07, 0,023 s'observent avec le *bulbe olfactif* dont le volume relatif diminue. L'accroissement différentiel du néocortex s'accompagne de sa « parcellisation » avec diversification des aires de projection sensorielles et motrices, développement des aires d'association et apparition d'une asymétrie hémisphérique qui inclut les centres spécialisés dans le langage. La représentation différentielle des diverses parties du corps (ou somatotopie) sur les cortex sensoriels et moteurs diffère de manière significative chez le singe et chez l'homme. Des millions, voire des milliards de neurones, possèdent donc des fonctions distinctes chez le singe et chez l'homme.

Cependant, ces cortex sont construits à partir d'éléments cellulaires neurones et cellules gliales, qui ne diffèrent que peu sur le plan morphologique. Par exemple, le cortex visuel présente chez le singe et chez l'homme le même nombre de couches cellulaires, les mêmes types de neurones pyramidaux, et les mêmes arborisations dendritiques. Les quelques différences notées sont de nature quantitative : accroissement du branchement des dendrites de base des cellules pyramidales ou du nombre relatif des cellules étoilées traduisant un accroissement de la connectivité interneuronale. Aucune morphologie cellulaire particulière n'est propre au cerveau de l'homme : il se distingue du cerveau du singe par le nombre, la distribution et surtout les relations entre cellules nerveuses plutôt que par l'organisation de la cellule nerveuse elle-même.

Les seules pièces anatomiques dont on dispose pour reconstituer l'évolution du cerveau chez les ancêtres directs de l'homme sont des crânes ou des fragments de crâne. La capacité crânienne est très voisine du volume propre du cerveau. Toutefois, dans les populations humaines actuelles une variabilité

significative de celle-ci et de la masse cérébrale a été notée entre groupes ethniques, d'un sexe à l'autre (8,3 g de cerveau par cm de stature chez l'homme contre 8,0 g chez la femme) ou entre individus du même sexe (Anatole France 1 000 g, Lord Byron 2 230 g). Néanmoins, les anthropologues s'accordent pour attribuer une signification majeure à l'accroissement de capacité crânienne qui s'observe de l'Australopithèque à l'*Homo sapiens sapiens* : soit pour *Australopithecus africanus* et *A. robustus* (7-1 millions d'années) : 640 cm<sup>3</sup>, pour *H. erectus* (1,9 million d'années - 100 000 ans) : 880 cm<sup>3</sup> (*H.e. erectus*) et 1 043 cm<sup>3</sup> (*H.e. pekinensis*), enfin pour *H. sapiens* (apparu il y a environ 35 000 ans) : 1 400 cm<sup>3</sup> en moyenne.

Les grands singes actuels, chimpanzé, orang-outan et gorille ont des capacités crâniennes moyennes respectivement de 398, 434, 543 cm<sup>3</sup>, donc du même ordre de grandeur que celles des australopithèques pour une taille corporelle similaire. L'analyse détaillée des moulages endocrâniens révèle, chez les ancêtres fossiles de l'homme, une expansion des cortex pariétal et temporal ainsi qu'une augmentation des circonvolutions dans la région de Broca. Il est pour l'instant difficile de préciser quand la latéralisation du cerveau et le langage articulé sont apparus. Liberman et Crelin (1975) ont tenté de « reconstituer » les parties molles du canal vocal supralaryngien (langue, lèvre, voile du palais) à partir des points d'insertion des muscles et ligaments (généohyoïdien et stylohyoïdien) engagés dans la production du langage articulé. Un programme d'ordinateur a été écrit et standardisé à partir des données anatomiques complètes recueillies chez l'homme adulte actuel, le nouveau-né et le chimpanzé. Appliqué aux données nécessairement fragmentaires recueillies sur des crânes d'*H.s. sapiens* fossile (Cro-magnon) et d'homme de Néanderthal (Chapelle au Saint), il a permis de mettre en évidence des différences notables au niveau des voies supra-laryngiennes de ces deux sous-espèces d'*H. sapiens*. D'après Liberman, l'homme de Néanderthal aurait eu des performances linguistiques très inférieures à celles de l'homme de Cro-magnon. Bien que doué d'une capacité crânienne égale ou légèrement supérieure à celle de l'homme actuel, l'homme de Néanderthal ne pouvait pas prononcer, semble-t-il, les voyelles a, i, u mais prononçait correctement y, w, g, k... Ces observations très fragmentaires et encore très spéculatives, suggèrent cependant que le langage articulé pourrait ne pas être apparu en une seule étape évolutive. Ce serait vraisemblablement le cas aussi des facultés cognitives qui y sont associées. Ainsi, l'*H. habilis* qui produisit les premiers outils en pierre taillée indiscutables et construisit les premiers murs de pierre avait une capacité crânienne inférieure de moitié à celle de l'homme moderne et devait sans doute posséder, de ce fait, un cerveau moins performant.

Un des phénomènes évolutifs les plus remarquables de l'histoire paléontologique de l'homme est donc ce doublement de volume cérébral qui se produisit de l'*H. habilis* à l'*H. neanderthalensis* en quelque 2 millions d'années

soit 50 à 100 000 générations. Un phénomène non moins remarquable est l'arrêt de cette croissance depuis 100 000 ans. De tels phénomènes encore inexpliqués ne se comprennent que si, au cours de l'histoire, les produits du fonctionnement cérébral sont intervenus sous une forme ou sous une autre (vraisemblablement sociale) pour stabiliser des gènes qui, eux-mêmes, déterminent l'organisation du cerveau.

Une des manières d'aborder les aspects génétiques de cette évolution est de comparer le matériel héréditaire de l'homme actuel à celui des singes anthropoïdes qui se seraient séparés du rameau proprement humain il y a 8 (orang-outan) ou 4 (chimpanzé, gorille) millions d'années. Les anthropoïdes possèdent tous 48 chromosomes alors que l'homme moderne n'en a que 46. L'examen attentif de la distribution des bandes qui apparaissent sur les chromosomes après coloration par la quinacrine ou le Giemsa a montré en fait que le chromosome 2 de l'homme résulte de la fusion de 2 chromosomes (2p et 2q) non homologues des grands singes (Dutrillaux, 1975). L'appareil chromosomique de l'homme est, donc, très semblable à celui des anthropoïdes. Seulement 13 remaniements chromosomiques, la plupart des inversions, distinguent le caryotype de l'homme de celui de l'orang-outan. La Trisomie 21 qui, on le sait, est responsable du mongolisme chez l'homme, existe aussi chez le chimpanzé et s'accompagne de symptômes similaires.

Les groupes sanguins ABO, MN, Rh couramment utilisés dans les études d'anthropologie sur le terrain se retrouvent également chez les singes anthropoïdes et même chez certains singes du nouveau monde. Toutefois, quelques antigènes sanguins propres au chimpanzé ne sont pas retrouvés chez l'homme (Ruffié).

La comparaison de la structure primaire complète de 8 protéines différentes (de 30 à 153 acides aminés) chez le chimpanzé et chez l'homme n'a révélé *aucune* différence pour 6 d'entre elles et 1 acide aminé différent pour 2 d'entre elles (hémoglobine et myoglobine). La comparaison fine par immunochimie et électrophorèse de 44 protéines différentes indique une différence moyenne de 8,2 substitutions pour 1 000 acides aminés dans la séquence de ces protéines entre le chimpanzé et l'homme. Des expériences d'hybridation d'ADN n'ont mis en évidence des différences de séquence nucléotidique que de l'ordre de 1,1 % (King et Wilson, 1975). Sur cette base on estime que la distance entre le chimpanzé et l'homme n'est que 25-60 fois plus élevée que celle existant entre Caucasiens, Africains et Japonais. Cette similitude du matériel génétique suggère que de l'australopitèque à l'homme actuel le matériel génétique n'aurait subi qu'un petit nombre de modifications (quelques remaniements chromosomiques, quelques centaines de mutations ou même moins) suffisantes néanmoins pour entraîner l'accroissement observé de masse et de complexité du cerveau. Seuls quelques

gènes « critiques » auraient donc été engagés dans cette évolution. Ceci représente une remarquable économie de moyens sur le plan génétique rendue possible par l'existence, déjà soulignée, d'une relation *non-linéaire* entre la complexité du génome et celle du système nerveux central.

S'il est hors de question de résoudre, pour l'instant, le paradoxe de cette non-linéarité on peut déjà remarquer que celle-ci repose sur la comparaison du génome de l'œuf fécondé et de l'organisation du cerveau adulte. Cependant, il est clair que la complexité du système nerveux ne peut être comprise simplement par l'examen de l'adulte. Celle-ci se construit progressivement au cours du développement embryonnaire et post-natal. S. Brenner, parmi d'autres biologistes moléculaires, a proposé qu'un tel processus de développement était déterminé par un « *programme génétique* » présent dans l'œuf fécondé. Cette notion de programme génétique vient d'être remise en question à juste titre par G. Stent. Le concept d'un programme unitaire est, de toute évidence, issu de la cybernétique dont les modèles s'appliquent correctement à la cellule bactérienne. Mais, passant de la bactérie à l'homme, on ne peut écrire simplement que « la complication d'organisation correspond à un allongement du programme » (F. Jacob). Il faut en effet remarquer que l'ADN possède une structure linéaire alors que le développement s'effectue dans les 3 dimensions de l'espace. Ensuite, programme sous-entend centre de commande unique. Or celui-ci n'existe matériellement sous cette forme que dans l'œuf fécondé : il se « délocalise » dès les premières étapes du développement embryonnaire.

A ce stade il devient utile de remplacer le schéma organisme-« machine cybernétique » par celui d'organisme-« système » (voir Von Bertalanffy). Le système, ensemble d'éléments en interaction entre eux (et avec l'environnement), se définira alors par l'énumération des éléments qui le composent, la description de leurs états et des transitions entre ces états, les relations entre éléments et leurs règles d'interaction. La notion abstraite de programme — bande magnétique se trouve remplacée par la description exhaustive d'un ensemble de processus spatio-temporels. Passant du vocabulaire théorique au vocabulaire observationnel, l'élément devient cellule embryonnaire (dont le nombre, la position, l'état... varie en fonction du temps), les règles d'interaction représentent les échanges réciproques de signaux entre cellules (encore très mal connus), l'état devient le répertoire de gènes « ouverts » ou « fermés ». L'abandon du concept de « programme génétique » incite à une description à la fois, plus précise et plus complète de la réalité et permet d'insister sur la contribution des interactions entre cellules dans le développement de l'organisme et la mise en place de la complexité de l'adulte. Dans ce contexte, le terme « déterminisme génétique », qui sera conservé, couvrira des processus très différents lorsqu'il s'agira de la structure primaire d'une protéine ou de « facultés » très intégrées comme celles du langage humain (Chomsky).

Dans le premier cas, il existera une relation univoque et non ambiguë entre la séquence des bases du gène de structure et la séquence des acides aminés de la protéine. Dans le second cas, on aura affaire à une fonction cérébrale qui met en œuvre des ensembles cellulaires considérables dont la disposition s'est construite progressivement au cours du temps et pas nécessairement de manière synchrone. Il ne sera plus alors possible de faire correspondre un gène à une fonction. La compréhension du déterminisme des fonctions très intégrées comme le langage passe donc, en principe, par celle des communications établies *entre* cellules embryonnaires, puis nerveuses, au cours du développement. La tâche n'est peut-être pas aussi irréaliste qu'elle le paraît. En effet, les communications entre cellules pourraient, elles-mêmes, être déterminées par un petit nombre de gènes spécialisés et l'entrée en action de quelques-uns de ces gènes de « communication » à des étapes critiques du développement s'accompagnerait d'effets majeurs sur l'organisation du système. La « simplicité d'une addition se traduirait par la complexité d'une intégration » (modifié d'après F. Jacob). Le paradoxe de la complexification du cerveau, sur la base d'un changement relativement restreint du nombre de gènes au cours de l'évolution de l'espèce humaine devient plausible si les produits de ces gènes interviennent, au cours du développement cérébral, dans des processus de communications « intégrés ».

Sturtevant et Beadle dans « An introduction to genetics » (1939) définissent la génétique comme « la science de l'hérédité et de la variation ». L'examen de la *variabilité* de l'organisation fonctionnelle du système nerveux fait donc partie de l'analyse des mécanismes génétiques qui déterminent cette organisation.

Au sein d'une espèce génétiquement hétérogène comme l'espèce humaine, s'observe une variabilité individuelle significative de la masse et même de l'histologie du cerveau. R. Guillery a analysé quantitativement cette variabilité au niveau du corps genouillé latéral. Sur les 58 cerveaux examinés, l'un provenait d'un nigérien albinos mort d'urémie et présentait, en accord avec les résultats obtenus chez le chat siamois (voir cours 1979), une réorganisation majeure des diverses couches de ce centre. Les autres présentaient des signes de fusion plus ou moins étendus entre les 8 couches du corps genouillé ; chez certains cerveaux, le segment à 8 couches même manquait complètement. Les causes d'une variabilité aussi importante, jusqu'alors insoupçonnée, ne sont connues que dans le cas de l'albinos où les altérations observées résultent, sans ambiguïté, d'une mutation génique.

Toute variabilité individuelle due à l'hétérogénéité génétique est considérablement réduite, sinon abolie, lorsque l'on compare des individus issus d'un même clône (*Daphnia magna* (crustacé), *Poecilia formosa* (poisson) (Levinthal)) ou faisant partie de lignées consanguines (*Coenorhabditis elegans*

(Nématode), Criquet, Souris). Dans le cas de *D. magna* ou *C. elegans*, le nombre total des cellules qui composent le système nerveux ne varie pas. On compte exactement 258 neurones chez *C. elegans*. Chez un vertébré comme la souris, la variance du nombre de neurones est, en pratique, difficile à estimer du fait de la valeur élevée des nombres concernés. Les travaux de Wimer *et al.* (1976) sur l'hippocampe montrent cependant que cette variance existe mais qu'elle est inférieure à celle observée d'une lignée consanguine à l'autre. La reproductibilité de l'organisation cellulaire du système nerveux chez un vertébré est moins fidèle que celle observée chez un petit invertébré : nématode ou crustacé.

La variabilité de la connectivité ne se superpose pas nécessairement à celle du nombre des neurones. Le nombre de synapses par neurone peut atteindre plusieurs milliers et on s'attend à ce qu'une variance phénotypique de la connectivité puisse exister même chez des organismes où le nombre de neurones est fixe. L'appréciation du « grain » de cette connectivité requiert l'observation au microscope électronique de coupes en séries complètes d'individus isogéniques (Lévinthal) suivie de la reconstruction de neurones identifiables et de leur arborisation. On constate une variance significative du nombre et de la distribution des branches axonales. Même le nombre de synapses (morphologiques) fluctue. Toutefois, une régularité dans la distribution de celles-ci entre neurones identifiés se conserve.

Dans le cas du criquet pèlerin, Pearson et Goodman (1979) ont réussi à comparer, à la fois, la morphologie de l'axone d'un interneurone cérébral particulier : le « descending contralateral movement detector » ou DCMD (par injection intracellulaire de colorant) et l'état fonctionnel de ses connexions synaptiques avec les motoneurones qui commandent les muscles des pattes (par enregistrement électrophysiologique). Fait remarquable : sur 28 individus examinés, l'axone du DCMD s'arrête au niveau du 3<sup>e</sup> ganglion thoracique pour 9 d'entre eux, au niveau du 1<sup>er</sup> ganglion abdominal, pour 16 d'entre eux, et au niveau des 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> ganglion abdominal pour 3 d'entre eux. Une variance phénotypique importante de la connectivité « fonctionnelle » s'observe donc chez le criquet parmi les individus d'une même colonie consanguine. Même dans le cas des espèces à nombre fixe de neurones et, *a fortiori*, dans les autres cas, l'organisation fonctionnelle du système nerveux n'est pas *exactement* reproductible d'un individu isogénique à l'autre.

Cette variance phénotypique de la connectivité a été notée partout où elle a été recherchée et l'hypothèse peut être proposée que celle-ci témoigne d'un mode particulier de développement du système nerveux. Dans ce cadre nous nous sommes intéressés, non plus à la variabilité d'un même neurone identifiable d'un individu isogénique à l'autre, mais à la variabilité des cellules nerveuses prises, chez un même individu, au sein d'une population

« morphologiquement homogène ». Reprenons le cas du Criquet et de l'innervation motrice des pattes. Dans chaque patte existent des muscles extenseurs rapides et lents. Wilson et Hoyle (1978) ont comparé la morphologie de deux neurones moteurs particuliers A et B qui se retrouvent dans les 3 ganglions thoraciques à la même position et avec une morphologie très voisine. Toutefois, alors que dans les deux premiers ganglions, le neurone A innerve les muscles extenseurs rapides et le neurone B les extenseurs lents, l'inverse se produit dans le 3<sup>e</sup> ganglion. Des neurones en apparence identiques et issus des mêmes neuroblastes embryonnaires acquièrent une spécialisation fonctionnelle différente dans les ganglions thoraciques antérieurs et postérieurs. Le cas des cellules de Purkinje du cervelet est tout aussi exemplaire. Chez le chat adulte on compte plusieurs millions de cellules de Purkinje, mais peu de caractères morphologiques permettent de distinguer chaque cellule de Purkinje de sa voisine. Toutefois, au niveau de l'aire de projection des muscles de l'œil, l'enregistrement unitaire permettra de distinguer, par exemple, celles qui répondent à l'étirement du muscle *rectus* latéral droit (par une diminution du rythme de décharge) de celles répondant à l'étirement du *rectus* médian gauche (par un accroissement du rythme de décharge). En d'autres termes, une spécialisation fonctionnelle existe au niveau d'une population en apparence morphologiquement homogène. Chaque cellule de Purkinje possède une « singularité » qui permet de la distinguer de sa voisine. Cette notion prend tout son sens lorsque l'on retrace l'origine embryonnaire de ces cellules par exemple par la méthode des chimères (voir cours 1979). On ne constate alors aucune relation directe entre la topologie des cellules de Purkinje chez l'adulte et la succession des divisions des précurseurs embryonnaires. Au cours de la migration qui suit les dernières divisions des précurseurs des cellules de Purkinje, celles-ci se redistribuent de manière statistique dans la couche qui porte leur nom. En d'autres termes, lorsqu'elles atteignent leur position finale, toutes les cellules de Purkinje sont équivalentes : elles possèdent le même état différencié et vraisemblablement le même répertoire de gènes ouverts.

La singularisation de la cellule nerveuse va donc consister en un accroissement de son « anisotropie » fonctionnelle qui va permettre de la distinguer de sa voisine. Celle-ci pourra résulter, par exemple, d'une localisation différentielle de molécules de récepteurs de neurotransmetteur qui, distribués, de manière uniforme à la surface de la cellule embryonnaire, vont s'agréger sous certaines terminaisons nerveuses. Il a aussi déjà été mentionné (voir cours 1977 et Changeux et Danchin, 1976) que lorsque les premiers contacts synaptiques se forment, ceux-ci apparaissent en nombre nettement supérieur à ceux qui persistent chez l'adulte. Cette exhubérance synaptique n'est que transitoire et laisse place à une stabilisation sélective de quelques contacts privilégiés qui confèrent au neurone sa spécificité fonctionnelle.

La thèse que nous avons défendue au cours des dernières années est que l'« activité » du réseau nerveux en développement intervient dans cette « singularisation ». Le terme activité désigne, pour nous, l'ensemble des processus qui, directement ou indirectement, se traduisent par un changement des propriétés électriques de la membrane neuronale. Il inclut la propagation du potentiel d'action, les processus de transmission synaptique (et de modulation) chimique, le couplage électrique... Ce choix se justifie pour plusieurs raisons : 1) tout phénomène électrique membranaire peut conduire à une intégration au niveau cellulaire, 2) dans le cadre du modèle « systémique » l'activité propagée par le réseau de neurones en développement représente un mode *d'interaction* entre éléments, cellules et organes (centres nerveux, organes des sens, effecteurs...), qui assure à la fois intégration et diversification. Du fait des propriétés de convergence et de divergence propres au réseau nerveux elle introduit une combinatoire nouvelle de signaux, 3) l'activité spontanée présente très tôt dans le développement embryonnaire peut être modulée, ou même prise en relais, par l'activité évoquée qui résulte de l'interaction de l'organisme en développement avec le monde extérieur. La combinatoire de signaux endogènes se trouve « enrichie » par les signaux évoqués. Ceux-ci peuvent alors participer à la singularisation qui, chez les mammifères et l'homme en particulier, se poursuit longtemps après la naissance, en particulier au niveau du cortex cérébral.

L'hypothèse de la participation de l'activité nerveuse à la régulation du développement embryonnaire permet d'introduire une importante économie de gènes dans la complexification du système nerveux.

\*\*

Sur le plan de l'observation expérimentale, des phénomènes électriques variés ont été observés dès les premiers stades du développement embryonnaire et même avec l'œuf vierge. C'est ainsi que l'oocyte du Xénope répond à l'acétylcholine par une dépolarisation ainsi qu'à la dopamine ou à la sérotonine par une hyperpolarisation (Kusano, Miledi et Stinnakre, 1977). Chez l'Axolotl, un couplage électrique efficace existe entre les premiers blastomères de l'œuf segmenté. Au moment de la formation de la gouttière neurale une différence de potentiel de membrane apparaît entre cellules ectodermiques (environ  $-30$  mV) et cellules nerveuses présomptives ( $-44$  mV). Lorsque le tube neural s'isole de l'ectoderme, le couplage électrique avec celui-ci disparaît. Des signes d'activité régénérative (rectification) apparaissent dans la membrane des neuroblastes mais ne se manifestent pas encore, à ce stade, par des potentiels d'action (Warner, 1973).

L'activité électrique du système nerveux de l'embryon a surtout été étudiée chez le poulet. Dès 1885, W. Preyer remarquait que, dès 3 jours 1/2 d'incubation, l'embryon est animé, dans l'œuf, de mouvements spontanés. Les

mouvements, d'abord unilatéraux, envahissent progressivement le corps de l'embryon et deviennent alternatifs et périodiques (activité de type I). Du 9° au 16° jour, des mouvements d'ensemble, brefs, de grande amplitude et arythmiques apparaissent ; l'embryon fléchit et étend ses pattes, bat des ailes, ouvre et ferme son bec (activité type II). Enfin, du 17° jour à l'éclosion, des mouvements stéréotypés et coordonnés se développent avec une séquence temporelle régulière ; c'est le cas du comportement qui permet au poussin de briser la coquille et sortir de l'œuf (activité de type III). La fréquence de l'ensemble des mouvements est maximale vers le 11° jour (20-25 mouvements par minute), au moment où se différencie l'innervation motrice, puis décroît jusqu'à l'éclosion.

Ces mouvements spontanés sont bloqués par le curare (Lévi-Montalcini et Visintini, 1938) et coïncident avec une activité électrique de même fréquence de la moelle. Sans ambiguïté la motricité embryonnaire est d'origine neurale. Des enregistrement électrophysiologiques effectués sur la moelle d'embryons révèlent, dès 5 jours, des unités à décharge périodique régulière et des unités à décharge en rafale. Les décharges en rafales polyneurales de grande amplitude et avec activité retardée deviennent de plus en plus fréquentes. Elles se propagent à l'ensemble de la moelle et sont responsables du déclenchement des mouvements (Provine, 1972). Des expériences de transection précoce (40-50 heures) de la moelle épinière au niveau cervical et thoracique (Oppenheim, 1973) ainsi que l'extirpation des racines dorsales sensorielles montrent que seuls les mouvements de type III sont sous commande supraspinale et requièrent l'arc réflexe médullaire tri-synaptique. Par contre, les mouvements de types I et II sont d'origine strictement spinale et résultent d'une activité électrique spontanée des motoneurones médullaires.

L'hypothèse d'un rôle éventuel de l'activité électrique spontanée dans la singularisation neuronale n'a de sens que si la mise en place de cette activité ne « coûte » pas plus d'information structurale que celle qu'elle est supposée déterminer. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à définir les éléments moléculaires minimum qui peuvent être rendus responsables d'une activité électrique spontanée. Nous avons été aidés par l'observation que cette activité est, le plus souvent, de type oscillatoire.

Dans un premier temps, les conditions thermodynamiques requises pour l'apparition d'oscillations ont été définies. Pour Prigogine et son groupe, celles-ci ne peuvent apparaître que dans un système thermodynamique « ouvert » qui échange en permanence de l'énergie avec le monde extérieur. De plus, ce système doit être dans un état de régime stable mais hors d'équilibre. Ces « structures dissipatives » peuvent apparaître lorsque des *relations non-linéaires* existent entre flux et forces du fait, par exemple, de l'existence d'interactions coopératives et d'effets de rétroaction (feedback) entre éléments du système.

Sur le plan expérimental, on doit distinguer dans le système nerveux deux modes d'oscillations. Certaines apparaissent dans des chaînes de neurones et dépendent directement de l'organisation de ces chaînes. C'est le cas par exemple des circuits engagés dans la commande des mouvements respiratoires chez les vertébrés ou de la marche chez certains insectes. D'autres apparaissent au niveau de cellules isolées comme les oscillations responsables de l'activité spontanée embryonnaire. Parmi ces oscillateurs « cellulaires » on distingue oscillateurs cytoplasmiques et oscillateurs membranaires.

La chaîne enzymatique de la glycolyse peut être prise comme exemple d'oscillateur cytoplasmique. Elle donne lieu à des oscillations entretenues, tant *in vivo* (levure) qu'*in vitro* (extrait acellulaire de muscle) (Hess, 1979 ; Goldbeter, 1980). La phosphofuctokinase joue un rôle critique dans ces oscillations puisqu'elle est l'objet d'une régulation négative de type rétroactif par l'ATP, « produit final » de la chaîne, et d'une régulation positive à la fois par son substrat : le fructose 6-phosphate (effet coopératif) et par les précurseurs de basse énergie de l'ATP : ADP et AMP. L'enzyme oscille entre deux états extrêmes. Dans l'état activé, le substrat (effecteur positif) disparaît et le niveau d'ATP (effecteur négatif) s'accroît jusqu'à ce que l'enzyme se retrouve dans l'état inhibé. Dans cet état, le substrat et l'ADP, effecteurs positifs, s'accumulent jusqu'à un niveau tel qu'ils réactivent l'enzyme. Les propriétés régulatrices de l'enzyme confèrent la « non linéarité » requise pour l'apparition d'oscillations dans un système qui se trouve « ouvert » du fait du flux d'entrée permanent de substrat.

Les neurones à rafales de mollusque, comme la cellule  $R_{15}$  du ganglion abdominal d'Aplysie (Strumwasser, 1965 ; Meech, 1979) constituent un des meilleurs exemples connus d'oscillateur membranaire. La cellule  $R_{15}$ , même isolée de toutes ses afférences, produit des rafales de 10-20 potentiels d'action toutes les 5-10 secondes avec une régularité d'horloge. Ces rafales se greffent sur un « oscillateur de base » composé de deux canaux *lents* distincts de ceux engagés dans le potentiel d'action : 1) un canal sélectif pour le  $Ca^{++}$  dont l'ouverture, sensible au potentiel, s'accompagne d'un courant entrant, dépolarisant, de  $Ca^{++}$  (ou  $Na^+$ ), 2) un canal sélectif pour le  $K^+$ , dont l'ouverture, activée par le  $Ca^{++}$  présent à l'intérieur de la cellule, s'accompagne d'un courant sortant, hyperpolarisant, de  $K^+$ . La dépolarisation régénérative (effet coopératif positif) associé à l'ouverture du canal  $Ca^{++}$  lent entraîne une augmentation de la concentration de  $Ca^{++}$  intracellulaire qui, en activant le canal  $K^+$  lent (rétroaction positive), provoque un changement de potentiel de signe opposé à celui qui a permis son entrée. On conçoit que, du fait de l'existence de ces boucles régulatrices, des oscillations lentes apparaissent. Lorsque le potentiel de membrane dépasse le seuil de genèse des potentiels d'action, des décharges en rafales apparaissent à la crête des ondes lentes. Ces décharges engagent des canaux ioniques *rapides* dont l'ouverture

entraîne des changements ioniques susceptibles de moduler l'oscillateur de base. L'ouverture des 4 types de canaux qui viennent d'être mentionnés entraîne une fuite passive d'ions compensée en permanence par un intense pompage actif par les ATPases membranaires. Ce système membranaire très simple se range donc dans la catégorie des systèmes thermodynamiques « ouverts ». Le schéma décrit dans le cas de l'oscillateur de base des neurones à rafale de mollusque s'applique, avec peu de modifications, aux oscillations de potentiel des fibres de Purkinje du cœur ou des cellules sécrétrices  $\beta$  du pancréas. Il rend compte vraisemblablement aussi des décharges en rafale qui se développent spontanément dans les neurones de la moelle épinière au cours de l'embryogénèse. Le prix à payer en gènes pour une activité spontanée de ce type est de toute évidence réduit à quelques gènes de structure.

Une activité électrique spontanée s'observe chez les embryons (ou fœtus) de vertébrés chaque fois qu'elle a été recherchée. Chez l'homme, en particulier, des mouvements spontanés, apparaissent au cours du 2<sup>e</sup> mois alors que le fœtus a encore moins de 4 cm ; ils affectent la tête et le tronc et ressemblent aux mouvements de type I de l'embryon de poulet. Pendant le 3<sup>e</sup> et le 4<sup>e</sup> mois, les mouvements se généralisent à l'ensemble du fœtus, les premiers réflexes apparaissent ainsi que la mimique faciale avec mouvements de succion et de déglutition (le fœtus boit le liquide amniotique). Ces mouvements qui commencent à être perçus par la mère se conservent après section supra-bulbaire et sont donc d'origine spinobulbaire. Ils présentent des analogies avec les mouvements de type II de l'embryon de poulet. Du 4<sup>e</sup> au 6<sup>e</sup> mois, des mouvements de plus en plus spécialisés se développent comme par exemple les mouvements respiratoires réguliers qui deviennent stables dès le 4<sup>e</sup> mois. Ces mouvements, modifiés par section supra-bulbaire, sont donc analogues des mouvements de type III. Comme chez le poulet, une phase d'accélération puis de décélération des mouvements a lieu au cours du développement fœtal avec un maximum (2-10 mouvements par minute) vers le 8<sup>e</sup> mois.

Une activité électrique spontanée, accompagne, évidemment, les mouvements du fœtus. Les premiers enregistrements de cette activité ont été obtenus au niveau du tronc cérébral chez des fœtus de 70 jours obtenus par césarienne (Bergström, 1969). Elle se poursuit en se diversifiant au cours des mois suivants.

D'un point de vue strictement méthodologique, il faut remarquer que les recherches sur ce thème se sont engagées dans des cadres conceptuels totalement différents lorsqu'il s'agissait de l'embryon de poulet et du fœtus humain. La technique d'enregistrement employée avec l'homme, l'électro-encéphalographie, a imposé une appréciation très globale de l'activité électrique cérébrale et de ce fait s'est trouvée concernée par ses manifestations les plus évidentes : celles qui coïncident avec l'alternance des états de veille

et de sommeil (Jouvet, 1977). Les recherches sur le « sommeil » de l'adulte, ont révélé l'existence de centres de commande, à activité oscillante périodique, constitués par des ensembles de neurones localisés dans divers noyaux de la région du pont. Ceux-ci, par leurs abondantes ramifications axonales « divergentes », distribuent des signaux à un grand nombre de régions, voire l'ensemble, du cerveau. C'est ainsi que le *locus coeruleus* antérieur commande l'éveil, le raphé antérieur le sommeil lent, etc. L'activité paradoxale qui apparaît pendant le sommeil lent, est constituée par un ensemble de phénomènes électriques spontanés de haut voltage qui se traduisent par des mouvements oculaires et une chute générale du tonus musculaire. Toutefois, cette activité électrique, d'origine subcéruléenne ne se manifeste pas, comme chez l'embryon, par des mouvements (sauf celui des yeux). Ceux-ci n'apparaissent, pendant le sommeil, qu'après destruction d'un centre qui les bloque au niveau médullaire (voir Jouvet, 1977).

Au cours du développement, l'oscillateur subcéruléen n'entre en action que tardivement : entre le 10° et le 20° jour *après* la naissance chez le chat (Adrien, 1978). Il prend, en quelque sorte, le relais des oscillateurs médullaires actifs chez l'embryon et le fœtus. Il est possible, mais non démontré, que l'activité paradoxale (souvent identifiée au « rêve ») joue chez l'adulte un rôle similaire à celui de l'activité spontanée embryonnaire, par exemple pour assurer la maintenance de la singularité neuronale perturbée par l'activité diurne ou bien, au contraire, pour consolider une trace créée par l'interaction avec l'environnement.

Chez l'embryon, l'activité nerveuse enregistrée est strictement endogène. Au fur et à mesure que les organes des sens deviennent fonctionnels, l'activité évoquée prend, pendant l'état de veille, le pas sur l'activité spontanée. Chez l'homme, le sens du toucher apparaît très précocement. Dès le 49° jour de vie intra-utérine, le fœtus répond à des stimulations tactiles des lèvres ; entre le 5° et le 7° mois, l'innervation sensorielle des doigts est pratiquement complète. L'appareil vestibulaire devient fonctionnel entre le 90° et le 120° jour, le sens auditif (suivi par les variations du rythme cardiaque) entre le 180° et le 210° jour. Des potentiels évoqués par un flash lumineux ont été enregistrés chez le prématuré qui ouvre ses yeux dès la 29° semaine après la conception. Toutefois, ces fonctions sensorielles fœtales sont loin d'avoir les mêmes performances que celles de l'adulte. Une maturation des organes des sens caractérisée par une diminution du seuil de sensibilité et une diminution du temps de latence se poursuit longtemps après la naissance.

L'homme naît avec un cerveau dont le poids est de l'ordre de 300 g. Celui-ci s'accroît environ 5 fois avant d'atteindre le poids adulte. Par contre, le poids de l'encéphale du chimpanzé, à la naissance, est déjà 60 % de celui de l'adulte. Dans le cervelet, les divisions cellulaires se poursuivent après

la naissance et l'essentiel de la synaptogénèse est postnatale. Dans le cortex cérébral, chez le chat comme chez l'homme, les arborisations dendritiques et les synapses se mettent en place après la naissance. Cragg (1975) estime que dans l'aire 17 du cortex visuel le nombre moyen de synapses par neurone passe de quelques centaines à plus de 12 000 entre le 10<sup>e</sup> et le 35<sup>e</sup> jour *après* la naissance, puis ce nombre diminue de manière significative (entre 20-30 %) jusqu'à la valeur adulte. Il est donc légitime de penser que l'activité évoquée par l'interaction avec l'environnement, prépondérante à ce stade, règle le développement de ces synapses.

On pourrait croire, en adoptant un point de vue empiriste, que l'interaction avec le monde extérieur provoque une activité « interne » du système nerveux dont les caractéristiques sont directement reliées aux types de signaux physiques reçus par les organes des sens. Il n'en est rien. Les potentiels d'action circulant dans le nerf auditif sont de nature identique à ceux enregistrés dans le nerf optique. L'analyse du fonctionnement des organes des sens, au niveau cellulaire, permet même d'aller plus loin. Dans la plupart des cas, l'effet du signal physique consiste en une modulation d'une activité spontanée qui, évidemment, préexiste à l'interaction avec l'environnement. Par exemple, chez le chat, l'illumination de la rétine s'accompagne d'une variation de l'activité des cellules ganglionnaires (« on ») qui passe de 40 à 70 impulsions par seconde (Barlow, 1968). Toujours chez le chat, les premiers signes d'activité spontanée apparaissent 8 jours après la naissance *avant* la réponse à la lumière. Autre exemple, au niveau du nerf afférent des récepteurs vestibulaires, on enregistre, chez l'adulte, une importante activité spontanée (jusqu'à 110 impulsions par seconde chez le singe). Lorsque la position de la tête change, cette activité varie, chez le chat, entre 5 et 35 impulsions par seconde (autour de la moyenne 20). Chez le rat (Curthoys, 1979), l'activité spontanée est enregistrée au niveau du nerf vestibulaire dès la naissance et augmente près de 6 fois pendant les 20 premiers jours qui suivent la naissance. La « sensibilité » au signal évolue de manière parallèle. On peut enregistrer les signes de cette activité jusqu'au niveau des neurones des noyaux vestibulaires et même du cortex cérébelleux. Les récepteurs sensoriels constituent donc des oscillateurs « périphériques » dont l'activité contribue, pour une part importante, à l'activité spontanée enregistrée au niveau des centres nerveux. *In fine*, l'interaction avec l'environnement qui conduit à une modulation du rythme des oscillateurs sensoriels périphériques va se manifester par la régulation d'oscillateurs centraux.

Les neurones à rafales d'Aplysie offrent une fois de plus un modèle de cette régulation au niveau cellulaire. La stimulation (10 impulsions par seconde pendant 4 minutes) du connectif droit du ganglion pariétoviscéral entraîne, au niveau du neurone R<sub>15</sub> de l'Aplysie, un arrêt des oscillations spontanées, puis une modification de la « structure » des oscillations qui reprennent après

la stimulation. Les rafales passent de 18 impulsions à 28 et l'intervalle entre rafales s'allonge. Cette modification persiste de 30 minutes à plusieurs heures après la stimulation (Parnas et Strumwasser, 1974). De même la stimulation du nerf palléal provoque chez l'escargot un arrêt prolongé des oscillations du neurone  $F_1$ . Ce blocage serait d'après Levitan *et al.* (1979) la conséquence d'une régulation directe, par les entrées synaptiques, des canaux lents  $K^+$  et  $Ca^{++}$  responsables de l'oscillateur de base. La lysine vasopressine ou l'ocytocine des vertébrés ainsi qu'un peptide présent dans le cerveau d'escargot accroissent, à partir d'une concentration seuil de  $10^{-9}M$ , jusqu'à plus de 10 fois l'activité spontanée du neurone  $F_1$  (Levitan, 1979). Les nucléotides cycliques participent à cette régulation. L'isobutylméthylxanthine, inhibiteur des phosphodiésterases des nucléotides cycliques, provoque un allongement important des rafales de même que les analogues non hydrolysables : par-chlorophénylthio- et 8 benzylthio- cyAMP. Une augmentation d'un facteur 4 du contenu intracellulaire en cyAMP suit l'application de ce peptide, et persiste plusieurs dizaines de minutes, enfin, il existe une adénylate cyclase activable par les peptides type vasopressine dans le système nerveux d'escargot. Il est possible, bien qu'encore pas démontré avec certitude, que le niveau intracellulaire de nucléotides cycliques règle le fonctionnement des canaux lents  $K^+$  ou  $Ca^{++}$  responsables des oscillations du potentiel de membrane.

On conçoit donc par quel mécanisme biochimique une activité évoquée au niveau d'oscillateurs périphériques peut moduler, à plus ou moins long terme, l'activité d'oscillateurs centraux. La mise en place de cette « trace » au niveau neuronal ne requiert, suivant ce schéma, qu'un petit nombre de macromolécules, récepteurs, cyclases, qui, par surcroît, peuvent être employées à des tâches différentes dans d'autres tissus. Le coût en gènes de structure, une fois de plus apparaît particulièrement limité. Enfin, contrairement à certaines théories biochimiques de la « mémoire », aucune synthèse d'espèces moléculaires *nouvelles* ne devient nécessaire pour qu'apparaisse une modification durable de propriétés neuronales à la suite d'une interaction de l'organisme avec son environnement.

\*  
\*\*

La thèse centrale d'un rôle de l'activité spontanée puis évoquée du réseau nerveux sur le développement de la singularité neuronale a été récemment mise à l'épreuve de l'expérience. Les résultats sont encore fragmentaires. On sait (voir cours 1977) que dans un grand nombre de centres nerveux, une mort cellulaire importante suit l'arrêt de la division des neuroblastes. Dans les colonnes motrices latérales de la moelle épinière, chez le poulet, 40 % des cellules (soit, environ 16 000 neurones) meurent entre le 5° et le 10° jour d'incubation. Cette mort affecte des cellules qui ont déjà atteint leur cible par leur axone moteur. Elle est accélérée par l'extirpation chirurgicale

du champ d'innervation périphérique (ébauche des pattes par exemple). La survie des neurones médullaires est donc soumise à une régulation par la périphérie. Au moment où la mort cellulaire survient dans la moelle, activité électrique et mouvements spontanés sont déjà présents depuis plusieurs jours. La paralysie chronique de l'embryon par injection de curare du 6<sup>e</sup> au 9<sup>e</sup> jour provoque une *réduction* significative de la mort cellulaire ; injecté *après* le 10<sup>e</sup> jour, le curare n'a pas d'effet (Pittman et Oppenheim, 1978). La mort cellulaire est donc soumise à une régulation « active » par le muscle qui requiert une transmission neuro-musculaire efficace. L'activité pourrait arrêter la synthèse, par le muscle, d'un facteur de survie rétrograde des motoneurones (voir Changeux, 1979).

Les expériences de Patterson et collaborateurs (voir cours 1978) montrent que le type de neurotransmetteur synthétisé par des neurones sympathiques en cultures est aussi soumis à une régulation par l'activité électrique. La localisation de la forme lourde de l'acétylcholinestérase au niveau de la basale qui recouvre la membrane sous-synaptique n'a pas lieu chez les embryons paralysés par les  $\alpha$ -toxines de serpent ou par le curare (Giacobini *et al.*, 1973 ; Bourgeois *et al.*, 1978). Dans les mêmes conditions, l'accumulation localisée de récepteur cholinergique a lieu. Enfin, la disparition du récepteur extrasynaptique au cours de la différenciation de la jonction neuro-musculaire est, elle aussi, réglée par l'activité électrique du muscle : celle-ci arrête la synthèse du récepteur qui, labile, finit par être éliminé de la surface du muscle (Bourgeois *et al.*, 1978). Les nucléotides cycliques pourraient intervenir dans cette régulation (Betz et Changeux, 1979).

Chez le poulet, les muscles lents, *anterior latissimus dorsi* (ALD), et rapides, *posterior latissimus dorsi* (PLD), sont innervés de manière différente. Chaque fibre musculaire de l'ALD reçoit plusieurs synapses distribués à égale distance les unes des autres ; les fibres du PLD au contraire ne possèdent qu'une seule synapse localisée au milieu de la fibre. Des expériences d'innervation croisée démontrent que le phénotype de l'innervation est déterminé non par le muscle mais par le nerf. Chez l'embryon de 16 jours, l'activité spontanée de l'ALD est soutenue et de basse fréquence (0,2 - 1 Hz), tandis que celle du PLD a la forme de rafales de haute fréquence (8 Hz) pendant 2 à 3 secondes espacées par des silences de plusieurs minutes. L'activité chronique des neurones innervant d'ALD et le PLD est-elle responsable de la différence de topologie synaptique ? Des électrodes de stimulation ont été implantées, en permanence, au niveau de la moelle épinière dorsale d'embryons de poulet de 7 jours et une stimulation électrique appliquée avec une fréquence de 0,5 Hz du 10<sup>e</sup> au 15<sup>e</sup> jour d'incubation (Toutant *et al.*, 1980). Les fibres musculaires isolées à partir des muscles PLD d'embryons stimulés présentent *plusieurs* agrégats de récepteur cholinergique au lieu d'un seul. L'apparition d'agrégats surnuméraires se traduit par un accroissement de

1,8 fois du nombre total d'agrégats par muscle. Toutefois, la distribution des agrégats du récepteur dans le PLD stimulé n'est pas aussi régulière que celle de l'ALD contrôle. Un modèle biochimique fondé sur 1) la modification chimique du récepteur, par un facteur antérograde libéré par le nerf et 2) l'agrégation différentielle du récepteur modifié, rend compte de ce phénomène (Courrège *et al.*, non publié). Bien qu'encore préliminaires, ces données et spéculations montrent comment une activité nerveuse est susceptible d'être « engrammée », au niveau cellulaire, sous la forme d'une distribution différentielle de molécules de récepteur.

Une fois l'emplacement de la membrane sous-synaptique marquée par le récepteur cholinergique et l'acétylcholinestérase, plusieurs terminaisons nerveuses motrices convergent vers celui-ci. Une multiinnervation polyneurone fonctionnelle de chaque fibre musculaire se met en place mais n'est que transitoire (Redfern, 1970 ; Bennett et Pettigrew, 1974 ; Brown *et al.*, 1976). Une seule terminaison nerveuse par plaque motrice persiste chez l'adulte et chaque neurone moteur innerve un nombre de fibres musculaires déterminé et caractéristique du type de muscle. Cette différenciation des unités motrices a lieu chez le rat *après* la naissance pendant la période d'apprentissage de la marche. L'arrêt du fonctionnement musculaire par section du tendon ou par blocage chronique de l'activité du nerf moteur s'accompagne de la persistance de la multiinnervation transitoire (Benoit et Changeux, 1975, 1976). En d'autres termes, la régression de l'innervation surnuméraire et la stabilisation sélective d'une terminaison nerveuse par synapse est un processus « actif » qui requiert un fonctionnement adéquat de l'innervation motrice.

Un état de « redondance synaptique » transitoire au cours du développement a aussi été mis en évidence dans le cas de l'innervation des cellules de Purkinje du cervelet par les fibres grimpantes : chez le rat de quelques jours chaque cellule de Purkinje reçoit 3-5 fibres grimpantes alors qu'une seule persiste chez l'adulte (Crépel, Mariani et collaborateurs, 1976-1980). Une situation analogue a été décrite avec le ganglion submandibulaire du rat (Lichtman et Purves, 1980). Enfin, dans le cortex visuel du singe, J. Lund et collaborateurs (1979) ont montré qu'au niveau du dendrite apical des neurones pyramidaux dont le soma se trouve dans la lamina III<sub>6</sub> le nombre d'épines par  $\mu\text{m}$  s'accroît jusqu'à la 10<sup>e</sup> semaine puis régresse de manière très significative pendant les semaines suivantes. Dans aucun de ces 3 derniers cas, il n'existe (pour l'instant) de preuve que l'activité du réseau nerveux en développement intervient dans la stabilisation sélective de la connectivité adulte. Il faut cependant noter que cette évolution se produit au moment précis où l'activité évoquée par l'interaction avec l'environnement devient prépondérante.

Pour rendre compte de l'ensemble de ces observations, les modèles biochimiques de stabilisation sélective des synapses labiles formées pendant la période

critique d'innervation redondante ont été proposés, par exemple, sur la base d'une utilisation « active » par les terminaisons nerveuses d'un stock limité de facteur rétrograde présent au niveau de la cible (voir Changeux, 1979). Ces modèles, encore préliminaires, illustrent comment la singularité neuronale peut se développer au sein d'une population de neurones possédant au départ le même état différencié sur la base d'une combinatoire limitée de signaux électriques spontanés ou évoqués et d'un nombre restreint de déterminants de structure.

Ces résultats et réflexions ne permettent, certes pas à eux seuls, d'expliquer la correspondance non-linéaire qui existe entre complexité du génome et complexité du système nerveux. Un progrès sera accompli s'ils la rendent déjà moins paradoxale.

J.-P. C.

#### SÉMINAIRES

##### *Intégration et distribution des récepteurs dans la membrane cytoplasmique*

J. CARTAUD : Etude ultrastructurale du récepteur cholinergique et intégration dans la membrane post-synaptique.

L. WENNOGLE : Structure transmembranaire du récepteur cholinergique.

R. HENDERSON : A model of the structure of bacteriorhodopsin.

A. ROUSSELET : Rôle structural des lipides et des protéines de la membrane post-synaptique de l'organe électrique de Torpille : une application de la résonance paramagnétique électronique.

A. MONNERON : Organisation transmembranaire des complexes récepteurs-adenyl cyclase. Distribution subcellulaire dans le système nerveux central.

M. CHABRE : Rhodopsine et autres protéines des membranes photoréceptrices de la rétine.

F. MOREL : Distribution différentielle des récepteurs hormonaux dans le tubule rénal.

P.N.T. UNWIN : Structure of the junction between communicating cells (gap junction).

P. BENOIT : Intégration et distribution des récepteurs neuronaux.

COMPTE RENDU D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE DE COMMUNICATIONS CELLULAIRES  
ANNÉE 1979

Pendant l'année 1979, l'activité du laboratoire 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 *Torpedo* sous forme purifiée ou intégrée à la membrane sous-synaptique et 2) le développement de la synapse étudié sur la jonction neuromusculaire de l'embryon de poulet et sur le cervelet de la souris et de quelques-uns de ses mutants neuropathologiques.

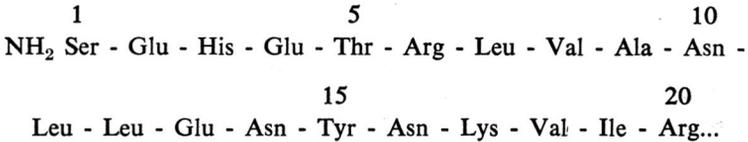
A) *PROTÉINE RÉCEPTRICE DE L'ACÉTYLCHOLINE*

1) *Séquence amino-terminale de la sous-unité de masse moléculaire 40 000*  
(A. DEVILLERS-THIÉRY *et al.*, 1979)

Les fragments de membrane riches en récepteur cholinergique, qui peuvent être préparés par centaines de milligrammes à partir de l'organe électrique de *Torpedo marmorata* (Sobel *et al.*, 1978), contiennent comme composant dominant une chaîne polypeptidique de masse moléculaire apparente de 40 000 daltons (voir Karlin *et al.*, 1976 et Heidmann et Changeux, 1978, pour revue). Ce polypeptide est marqué de manière covalente par les réactifs d'affinité spécifiques du site récepteur de l'acétylcholine : avec les membranes natives, le TDF (Changeux *et al.*, 1967 ; Wieland *et al.*, 1979) ou des dérivés de toxine  $\alpha$  de venin de serpent (Witzmann et Raftery, 1978 ; Hucho, 1979) ; après réduction par des réactifs de ponts disulfures, le MPTA, le MBTA (Karlin et Cowburn, 1973) et la bromoacétylcholine (Damle *et al.*, 1978 ; Moore et Raftery, 1979). Sans ambiguïté la chaîne 40 K porte le site où l'acétylcholine exerce son action physiologique.

Cette année, une méthode de purification à grande échelle de la sous-unité 40 K a été mise au point (Devillers-Thiéry *et al.*, 1979). Des fragments de membranes riches en récepteur sont d'abord traités à pH 11 (Neubig *et al.*, 1979) pour se débarrasser des peptides qui ne font pas partie du récepteur tels que, par exemple, la chaîne 43 K. Puis, ils sont soumis à une électrophorèse préparative sur gel d'acrylamide en SDS. En partant de 45 mg (en protéine) de fragments de membrane traités à pH 11 on obtient après électroélution du gel, environ 1,5 mg de polypeptides marqués au MPTA sous forme pure, ce qui est une quantité suffisante pour effectuer une analyse de séquence. La séquence amino-terminale a été déterminée par dégradation d'Edman automatisée sur un séquenceur Beckman 890 C. Les résidus phenylthiohydantoïne ont été identifiés à la fois par chromatographie

liquide à haute pression et par chromatographie en couche mince. La séquence obtenue sur 4 préparations est la suivante :



Une hétérogénéité mineure a été notée pour les cinq premières étapes avec quatre préparations de la sous-unité 40 K mais pas avec une cinquième. Les composants mineurs sont donc des contaminants. Cette séquence vient d'être confirmée récemment avec la chaîne 40 K purifiée de *Torpedo californica* (Hunkapiller *et al.*, 1979). Les vingt premiers résidus de la chaîne 40 K comprennent une proportion remarquablement grande à la fois d'acides aminés chargés (3 acides, 4 basiques) et d'acides aminés hydrophobes (4 leucine ou isoleucine, 2 valine, 2 asparagine). La cysteine marquée au {H<sup>3</sup>}-MTPA ne fait pas partie des quarante premiers acides aminés de la chaîne.

- 2) *Synthèse et activité pharmacologique d'un marqueur de photoaffinité dérivé d'un bloquant non-compétitif, le trimethisoquin ; son emploi pour le marquage sélectif des chaînes polypeptidiques présentes dans les fragments de membrane riches en récepteur cholinergique* (WAKSMAN *et al.*, 1980 ; OSWALD *et al.*, 1980)

Les fragments de membrane riches en récepteur cholinergique de Torpille donnent, après électrophorèse en une dimension sur gel d'acrylamide et en présence de SDS, 4 bandes de protéines de masse moléculaire apparente 40, 43, 50, 60 et 66 000 daltons (pour revue voir Heidmann et Changeux, 1978 ; Raftery *et al.*, 1979 ; Karlin *et al.*, 1979). D'autre part, les fragments de membrane riches en récepteur purifié possèdent deux classes de sites de liaison topographiquement distincts : le site récepteur de l'acétylcholine et des sites qui lient les bloquants non-compétitifs tels que les anesthésiques locaux aminés (Weber et Changeux, 1974 ; Cohen *et al.*, 1974 ; Krodell *et al.*, 1979) ou la toxine de grenouille histrionicotoxine (Eldefrawi *et al.*, 1978 ; Kato et Changeux, 1976 ; Elliott et Raftery, 1979). Comme indiqué ci-dessus, la chaîne 40 K porte la première classe de site. Cette année, afin d'identifier la, ou les, chaîne(s) qui portent la deuxième classe de site, un marqueur de photoaffinité dérivé du bloquant non-compétitif trimethisoquin a été synthétisé (Waksman *et al.*, 1980). Ce 5-azido trimethisoquin bloque de manière irréversible la dépolarisation de l'électroplaque de *Electrophorus electricus* provoquée par la carbamylcholine en réduisant la réponse maximum sans changer la constante apparente de dissociation.

Un dérivé tritié du 5-azido triméthisoquin ( $H^3$  sur le N-méthyl) a été utilisé pour le marquage *in vitro* des fragments de membrane riches en récepteur cholinergique de *T. marmorata* (Oswald *et al.*, 1980). Dans les fragments de membrane au repos, le  $\{H^3\}$ -5AT marque essentiellement la chaîne 40 K du récepteur. Quand les fragments de membrane sont préincubés avec l' $\alpha$ -bungarotoxine, ce marquage décroît d'une manière significative, ce qui indique que le  $\{H^3\}$ -5AT se lie de manière covalente au site récepteur de l'acétylcholine. Ce résultat est en accord avec la présence d'un ammonium quaternaire sur la molécule de 5AT. De plus, une incorporation légère mais significative de radioactivité est notée au niveau des chaînes 50 et 66 K. En présence de carbamylcholine ce marquage s'amplifie d'une manière très importante tandis que celui de la chaîne 40 K disparaît. Le marquage des polypeptides 50 et 66 K est complètement aboli par l'histrionicotoxine ou le triméthisoquin non-radioactif et l'effet de la carbamylcholine sur ce marquage est bloqué par l' $\alpha$ -bungarotoxine. La spécificité de liaison covalente de  $\{H^3\}$ -5AT sur les chaînes 50 et 66 K ainsi que la régulation de cette liaison par les ligands cholinergiques sont celles que l'on attend de l'interaction avec le site de liaison des anesthésiques locaux (pour discussion voir Heidmann et Changeux, 1978 et Krodel *et al.*, 1979). L'extraction de la chaîne 43 K de la membrane par le traitement à pH 11 ne change pas le marquage de celle-ci par le  $\{H^3\}$ -5AT ce qui confirme que la chaîne 43 K n'est pas impliquée dans la liaison des bloquants non-compétitifs et dans leur interaction allostérique avec le site récepteur de l'acétylcholine (Neubig *et al.*, 1979).

On ne comprend toujours pas pourquoi le  $\{H^3\}$ -5AT marque deux chaînes polypeptidiques distinctes au lieu d'une seule (comme cela a lieu par exemple avec le  $\{H^3\}$ -MPTA et la chaîne 40 K). Une possibilité parmi d'autres est que le polypeptide 50 K porte le même site que le polypeptide 66 K mais dérive de ce dernier, par exemple, à la suite d'un clivage protéolytique.

### 3) *Orientation transmembranaire des protéines présentes dans les fragments de membrane riches en récepteur cholinergique*

(WENNOGLE et CHANGEUX, 1979, 1980)

Les enzymes protéolytiques sont des outils fort utiles pour étudier l'orientation transmembranaire des protéines puisque étant des macromolécules elles ne traversent pas les membranes biologiques. Elles ont été utilisées dans ce but cette année avec les fragments de membrane riches en récepteur (Wennogle et Changeux, 1979, 1980). Avec une membrane intacte on trouve que les polypeptides 40, 43, 50 et 66 K résistent de manière remarquable à des concentrations très élevées de pronase et de trypsine. D'autre part, des traitements connus pour ouvrir les fragments de membrane comme la sonification, rendent les 4 chaînes polypeptidiques susceptibles à la dégradation protéolytique dans la mesure où la trypsine est présente *pendant* le traitement.

L'interprétation la plus simple de ces observations est que les fragments de membrane riches en récepteur forment des vésicules closes avec la face externe de la membrane plasmique tournée vers l'extérieur ; ces vésicules résistent aux protéases et leur ouverture rend les 4 chaînes polypeptidiques susceptibles à l'attaque protéolytique au niveau de sites normalement exposés sur la face *interne* de la membrane.

L'incubation à pH 4 avec la pepsine, le chauffage à 62° C pendant 1 minute suivi d'une digestion par la trypsine rendent les chaînes 40, 50 et 66 K susceptibles à la protéolyse sans ouvrir les vésicules membranaires. Dans ces deux conditions la chaîne 43 K résiste à l'attaque protéolytique mais est dégradée dès que ces fragments de membrane sont soumis aux ultrasons en présence d'enzyme protéolytique. On conclut de ces observations que la chaîne 43 K est un polypeptide strictement « interne » tandis que les chaînes 40, 50 et 66 K traversent la membrane.

Au cours de ce travail il a été trouvé que l'attaque protéolytique ménagée des fragments de membrane fournit des produits de dégradation stables des diverses chaînes polypeptidiques. Par exemple, la chaîne 40 K donne en présence de trypsine un fragment de masse moléculaire apparente 35 K qui porte toujours le marqueur  $\{H^3\}$ -MPTA. Sa séquence  $NH_2$ -terminale est la même que la chaîne 40 K native ce qui indique que l'attaque a débuté à la partie C-terminale de la chaîne, celle-ci doit donc se trouver localisée sur la face interne de la membrane.

Le polypeptide 66 K a été trouvé le plus susceptible à la protéolyse ; il donne un produit de dégradation stable de 40 K. La bande 50 K a été trouvée la plus résistante à la dégradation mais devient systématiquement plus abondante à des concentrations faibles de protéase ce qui suggère qu'elle dérive de la chaîne 66 K.

- 4) *Effet d'une toxine phospholipasique, la crottoxine, sur la réponse de l'électroplaque et des fragments de membrane riches en récepteur cholinergique aux agents cholinergiques*  
BON *et al.*, 1979)

Dans un travail précédent, il a été mentionné qu'une neurotoxine acide présente dans le venin du serpent *Bungarus caeruleus* (en fait il s'agit du serpent cambodgien *B. fasciatus*) et appelée céruléotoxine, bloque la réponse de perméabilité de l'électroplaque et des fragments de membrane riches en récepteur cholinergique sans affecter directement le site récepteur (Bon et Changeux, 1977). Cette toxine possède une activité phospholipasique comme la toxine du *Crotale* : la crottoxine. Comme cette dernière peut être préparée plus facilement que la céruléotoxine, son mécanisme d'action a été analysé en détail cette année (Bon *et al.*, 1979).

La crotoxine est composée de deux sous-unités (Hendon et Fraenkel-Conrat, 1971) : une phospholipase A<sub>2</sub> basique avec une toxicité faible (composant B) et une protéine acide qui paraît ne pas posséder d'activité biologique intrinsèque (composant A). La toxine native et son unité phospholipasique isolée bloquent l'une et l'autre la dépolarisation provoquée par les agents cholinergiques sur l'électroplaque isolée de *E. electricus*. L'autre composant, qui est inactif lorsqu'il est appliqué seul, augmente l'activité pharmacologique de la phospholipase lorsqu'elle lui est ajoutée. La crotoxine bloque aussi l'accroissement de l'efflux de sodium 22 provoqué par la carbamylcholine sur les microsacs excitable préparés à partir de *T. marmorata*. La crotoxine agit donc sur la membrane post-synaptique mais, comme la céruléotoxine, n'interfère pas avec la liaison des toxines  $\alpha$  ou des agents cholinergiques sur le site récepteur. Au contraire, comme les bloquants non-compétitifs, elle stabilise le récepteur cholinergique dans un état de haute affinité pour les agonistes qui correspond à une forme désensibilisée, pharmacologiquement inactive, du complexe récepteur-ionophore (voir Heidmann et Changeux, 1978, 1979, pour discussion). Le mécanisme détaillé de la stabilisation de l'état de haute affinité (et donc le blocage de la réponse) consécutif à l'action de la phospholipase n'est pas encore connu. Les acides gras exercent le même effet (Brisson *et al.*, 1975), et il est donc concevable que les produits de l'activité phospholipasique aient un effet similaire. En tout état de cause ces observations illustrent l'importance de l'environnement lipidique sur les propriétés fonctionnelles du récepteur cholinergique.

Les composants A et B ont été rendus radioactifs sans dénaturation et leur liaison sur les fragments de membrane mesurée. Le composant B qui porte l'activité phospholipasique se lie, lorsqu'il est seul, à un très grand nombre de sites non saturables présents sur les fragments de membrane. En présence du composant A le nombre de sites sur lequel il se fixe diminue de manière très importante, mais ces sites sont saturables et leur concentration est voisine de celle des sites récepteurs cholinergiques. Le composant A dirigerait donc la phospholipase vers des sites critiques, présents dans la membrane sous-synaptique et de ce fait augmenterait sa toxicité. L'identification de ces sites « spécifiques » est en cours.

##### 5) Reconstitution d'un récepteur cholinergique fonctionnel

(CHANGEUX *et al.*, 1979 ; SOBEL *et al.*, 1980 ; HEIDMANN *et al.*, 1980 ; POPOT et CHANGEUX, 1980)

Comme cela a déjà été mentionné dans le rapport de 1978 la méthode que nous avons suivie pour définir les conditions d'une reconstruction reproductible des flux d'ions sensibles à l'acétylcholine se fonde sur la mesure des cinétiques rapides des transitions conformationnelles du récepteur cholinergique et sur l'effet allostérique des bloquants non-compétitifs sur ces tran-

sitions. Il est désormais bien établi que la protéine réceptrice peut exister sous plusieurs états d'affinité pour les agonistes et une condition nécessaire mais évidemment pas suffisante pour une reconstitution efficace est que, dans le matériel reconstitué, la majorité des molécules de récepteur sont sous un état de faible affinité pour les agonistes qui, comme cela existe dans le cas des membranes natives, peut être interconverti lentement vers un état de haute affinité. De plus, cette transition lente doit être accélérée par les anesthésiques locaux ou, d'une manière plus générale, les bloquants non-compétitifs (pour discussion voir Heidmann et Changeux, 1978, 1979). Une méthode de titration de cet état de faible affinité, interconvertible, du récepteur cholinergique a été mise au point en suivant les cinétiques rapides d'interaction de l'agoniste fluorescent C<sub>5</sub>DACHol (Waksman *et al.*, 1977) dans un appareil de mélange rapide équipé pour les mesures de fluorescence (voir Heidmann et Changeux, 1979). Un protocole simple de solubilisation de fragments de membrane riches en récepteur par le cholate de sodium suivie d'une élimination du détergent par filtration sur une colonne de Sephadex ou dialyse produit un récepteur reconstitué qui présente toutes les propriétés cinétiques du récepteur membranaire sous son état natif (Heidmann *et al.*, 1978 ; Changeux *et al.*, 1979).

Cette année, les conditions détaillées d'une reconstitution reproductible des propriétés de liaison ont été établies (Sobel *et al.*, 1980 ; Heidmann *et al.*, 1980 a, b). En ce qui concerne la composition en chaîne polypeptidique et, en accord avec les résultats de Neubig *et al.* (1979), la chaîne 43 K n'apparaît pas nécessaire. Une reconstitution satisfaisante est obtenue avec des préparations ne contenant que les chaînes 40, 50 et 66K même lorsque ces deux composants mineurs représentent ensemble moins de 10 % (mole/mole) de la sous-unité 40 K (Sobel *et al.*, 1980). Le récepteur reconstitué fixe encore de manière réversible le bloquant non-compétitif {H<sup>3</sup>}-triméthisoquin et d'une manière irréversible son dérivé de photoaffinité {H<sup>3</sup>}-5AT (Oswald *et al.*, 1980). De plus, la carbamylcholine accroît encore la liaison de ces deux composés et en particulier la liaison covalente du {H<sup>3</sup>}-5AT sur les chaînes 50 et 66 K (Oswald *et al.*, 1980).

Plusieurs traitements auxquels la protéine réceptrice de l'acétylcholine est soumise lors de la solubilisation par les détergents ou la purification interfèrent avec la reconstitution. Ce sont par exemple : l'exposition à des concentrations élevées de cholate (3 %), la dilution de l'extrait en cholate et son ultracentrifugation ou sa filtration sur colonne en présence de cholate. Dans ces conditions, la protéine réceptrice est stabilisée d'une manière irréversible dans un état de faible affinité pour les agonistes qui ne peut plus être interconverti vers un état de haute affinité et reste insensible aux bloquants non-compétitifs (Heidmann *et al.*, 1978, 1980). D'autre part, il a été montré que lorsque la concentration de lipides est maintenue élevée par exemple

en ajoutant à l'extrait un mélange complexe de lipides, l'asolectine (Epstein et Racker, 1978), aucun des traitements mentionnés plus haut n'interfère plus avec la reconstitution. De plus, en présence de cholate, à condition toutefois que la concentration de lipides soit maintenue élevée, une forme soluble de faible affinité et de coefficient de sédimentation 9 S peut être obtenue. Sous cette forme la protéine réceptrice a conservé la plupart des propriétés caractéristiques du récepteur membranaire : en particulier l'interconversion lente vers un état de haute affinité et l'effet des anesthésiques locaux sur cette transition. Après élimination du détergent, une fraction reconstituée est obtenue qui montre encore les mêmes propriétés de liaison caractéristiques. En d'autres termes, une reconstitution réussie, requiert la conservation des propriétés cinétiques de la protéine réceptrice au cours de l'étape de solubilisation. D'un point de vue méthodologique, il est clair que les lipides jouent un rôle critique dans la conservation des propriétés fonctionnelles du récepteur cholinergique dans son état soluble et que, en pratique, leur concentration doit être maintenue à un niveau suffisamment élevé pendant toutes les étapes de purification effectuées en présence de cholate (Heidmann *et al.*, 1980 a, b).

6) *Phosphorylation in vitro des fragments de membrane riches en récepteur cholinergique de T. marmorata*  
(SAITOH et CHANGEUX, 1980)

Dans des rapports précédents (1976-1977), il a été montré que plusieurs des chaînes polypeptidiques présentes dans la protéine réceptrice purifiée de *E. electricus* et dans les fragments de membrane riches en récepteur de Torpille, pouvaient être phosphorylées sélectivement *in vitro*. Cette année, le travail expérimental a porté exclusivement sur les fragments de membrane riches en récepteur cholinergique de *T. marmorata* (Saitoh et Changeux, 1980). La chaîne 40 K n'a jamais été trouvée phosphorylée *in vitro* par des kinases endogènes. D'un autre côté, les polypeptides 43, 50 et 66 K deviennent phosphorylés systématiquement en présence de cations divalents ( $Mg^{++}$  ou  $Mn^{++}$ ). Le potassium (mais pas le sodium) accroît sélectivement la phosphorylation de ces trois peptides mais les effecteurs cholinergiques, les bloquants non-compétitifs et les nucléotides cycliques n'ont aucun effet. Au cours de ces études, il a été montré que la phosphorylation avait un effet original sur les membranes en agissant sur leur « structure » : les chaînes 43, 50 et 66 K sont solubilisées sélectivement par les détergents non-dénaturants à des concentrations plus faibles que les chaînes non-phosphorylées.

L'hétérogénéité de charge remarquée pour la chaîne 43 K sur des gels à deux dimensions pourrait résulter d'une phosphorylation sélective mais cela ne semble pas être le cas pour la microhétérogénéité observée avec la chaîne 40 K.

7) *Régulation de la susceptibilité de la protéine sélective de T. marmorata à l'inactivation thermique par des facteurs intrinsèques et extrinsèques* (SAITOH *et al.*, 1980)

La susceptibilité d'une protéine à l'inactivation thermique est une propriété globale qui peut révéler des différences mineures de structure de la molécule ou de son environnement proche. Elle a été utilisée cette année pour mettre en évidence l'effet éventuel de l'environnement membranaire proche (en particulier la protéine 43 K) et de modifications covalentes (en particulier la phosphorylation) sur les propriétés structurales du récepteur cholinergique. L'extraction de la chaîne 43 K par traitement à pH 11 suivant la méthode de Neubig *et al.* (1979), augmente la vitesse d'inactivation des sites de liaison de l' $\alpha$ -bungarotoxine à 62 °C, réciproquement, une stabilité thermique normale est obtenue à nouveau lorsque le surnageant contenant la protéine 43 K est mélangé avec les membranes traitées à pH 11 et neutralisé. D'une manière directe ou indirecte, la chaîne 43 K protège la protéine réceptrice contre l'inactivation thermique.

En plus de ce mode de régulation *extrinsèque* de la stabilité du récepteur cholinergique, il est démontré que des modifications *intrinsèques* de la molécule pouvaient jouer un rôle semblable sinon plus spectaculaire. Le traitement à pH acide accroît la vitesse d'inactivation de la protéine réceptrice par approximativement un facteur 5 et cet effet est conservé *après* solubilisation de la protéine réceptrice par le Triton X-100. Lorsque le récepteur solubilisé par le Triton X-100 est traité par la phosphatase alcaline d'*Escherichia coli* (qui est connue pour déphosphoryler les phosphoprotéines) (Nielsen *et al.*, 1977), on observe encore un accroissement de la susceptibilité thermique de la protéine réceptrice. Un tel traitement n'est toutefois plus efficace lorsqu'il est effectué sur la protéine réceptrice extraite de membranes traitées à pH acide. Ceci suggère que le traitement à pH acide et la phosphatase agissent sur la même cible, c'est-à-dire provoquent la déphosphorylation d'un phosphopeptide présent dans la préparation de récepteur soluble et, de ce fait, accroissent sa susceptibilité à l'inactivation thermique (Saitoh *et al.*, 1980).

On peut imaginer que ce sont des facteurs « extrinsèques » et/ou « intrinsèques » de ce type qui expliquent les différences observées entre récepteurs sous-synaptique et extra-synaptique ; de tels facteurs pourraient éventuellement jouer un rôle dans la formation de la membrane sous-synaptique au cours de l'embryogénèse.

8) *Métabolisme de la protéine réceptrice de l'acétylcholine au cours du développement de la jonction neuromusculaire* (Voir BETZ *et al.*, 1980)

Cette année la recherche a porté sur deux points précis de ce problème général : 1) l'identification des signaux chimiques responsables du couplage

entre activité électrique du muscle et synthèse du récepteur cholinergique (Betz *et al.*, 1979) et 2) un rôle éventuel de l'activité sur la différenciation de la distribution des agrégats de récepteur cholinergique dans le muscle *posterior latissimus dorsi* de l'embryon de poulet (Toutant *et al.*, 1980).

Il est désormais bien établi que, *in vivo*, l'activité spontanée (ou évoquée) des muscles en développement provoque l'arrêt, ou réprime, la synthèse de récepteur cholinergique (Burden, 1977 ; Bourgeois *et al.*, 1978) et, par voie de conséquence, provoque la disparition du récepteur extra-synaptique. Une situation semblable peut être reproduite *in vitro* avec des cultures primaires de myotubes d'embryons de poulet : par exemple, la tetrodotoxine, qui bloque l'activité spontanée des myotubes, provoque une accumulation de sites muscle PLD a été étudié sur des embryons de poulet *in ovo* (Toutant *et al.*, 1976 ; Betz *et al.*, 1979). Réciproquement, l'agent dépolarisant, la vératridine, provoque une diminution du contenu total des myotubes en sites récepteurs cholinergiques (Betz *et al.*, 1979). Dans ces deux cas, la demi-vie de la molécule de récepteur cholinergique ne change pas et l'effet résulte donc d'une régulation de la synthèse de récepteur. Ces deux situations peuvent être reproduites en présence des dérivés dibutyryl des nucléotides cycliques cAMP et cGMP. En présence du dibutyryl cAMP dans le milieu de culture, la synthèse de récepteur cholinergique s'accroît mais c'est aussi le cas de la synthèse d'un grand nombre de protéines cellulaires. Par contre, le dibutyryl cGMP a un effet beaucoup plus sélectif sur la synthèse de récepteur cholinergique. Le dibutyryl cGMP antagonise l'effet de la tetrodotoxine mais son effet ne s'ajoute pas à celui de la vératridine. Le GMP cyclique est donc un candidat potentiel pour le messenger intracellulaire qui sert d'intermédiaire dans la régulation de la synthèse de récepteur cholinergique extrasynaptique par l'activité électrique de la cellule.

Il y a plusieurs années, un mécanisme a été proposé pour rendre compte d'effets éventuels de l'activité sur la « spécification » de réseaux de neurones (Changeux *et al.*, 1973 ; Changeux et Danchin, 1976). Pour mettre cette théorie à l'épreuve, l'effet de la stimulation électrique chronique de la moelle épinière sur la distribution des agrégats de récepteur cholinergique dans le muscle PLD a été étudié sur des embryons de poulet *in ovo* (Toutant *et al.*, 1980). Des électrodes ont été implantées autour de la moelle épinière d'embryons de 7 jours et des impulsions électriques envoyées à la fréquence de 0,5 Hz du 10<sup>e</sup> au 15<sup>e</sup> jour d'incubation. Le nombre et la distribution des agrégats de récepteur cholinergique ont été suivis par autoradiographie après marquage du muscle disséqué par l'<sup>125</sup>I- $\alpha$ -bungarotoxine. Les comptages et les mesures de longueurs ont été effectués sur des fragments de fibres musculaires uniques isolées et sur des sections complètes de muscle. Le muscle PLD normalement reçoit une innervation « focale » (une plaque motrice par fibre musculaire). Après stimulation chronique, plusieurs agrégats de récep-

teur cholinergique apparaissent par fragment de fibre musculaire isolée à partir du PLD. Parallèlement, le nombre total d'agrégats de récepteur cholinergique par muscle PLD, déterminé sur coupes sériées, s'accroît en moyenne 1,8 fois sans changement du nombre total de fibres musculaires. La distribution des agrégats, toutefois, est moins régulière que dans le muscle *anterior latissimus dorsi*, qui reçoit une innervation « distribuée » dans les embryons contrôles. Des expériences sont en cours pour établir la nature des relations existant entre ces agrégats surnuméraires de récepteur et les terminaisons nerveuses motrices. L'accroissement du nombre d'agrégats de récepteur est-il parallèle à l'accroissement du nombre de synapses ?

## B) SYNAPTOGÉNÈSE DANS LE CERVELET DE LA SOURIS ET DE QUELQUES-UNS DE SES MUTANTS NEUROPATHOLOGIQUES

(MARIANI, 1980 ; MARIANI et CHANGEUX, 1980)

Les études microphysiologiques effectuées dans le laboratoire depuis plusieurs années et déjà exposées dans les rapports précédents ont permis, en particulier, d'établir chez le jeune rat l'existence d'une multiinnervation transitoire des cellules de Purkinje par les fibres grimpantes qui précède la monoinnervation de l'adulte (Crépel *et al.*, 1976). La mise en place des grains jouerait un rôle dans la régression de cette « redondance synaptique » transitoire puisque la multiinnervation persiste à l'état adulte dans les cervelets pauci- ou agra- nulaires des souris mutantes *weaver* et *reeler* (Crépel et Mariani, 1976 ; Mariani *et al.*, 1977).

Le travail effectué cette année a concerné essentiellement les relations olivo-cérébelleuses chez un autre mutant, la souris « staggerer ». Des grains sont présents dans le cervelet de ce mutant mais leurs axones, les fibres parallèles, n'établissent pratiquement aucune synapse avec les dendrites des cellules de Purkinje qui sont dépourvues d'épines tertiaires. Une première étude électrophysiologique (enregistrements unitaires extracellulaires) n'avait pas permis d'établir l'existence de synapses fonctionnelles entre fibres grimpantes et cellules de Purkinje chez ce mutant (Crépel et Mariani, 1975).

a) Dans un premier temps, des enregistrements unitaires extracellulaires des cellules de l'olive inférieure (Mariani, 1978, 1980) (dont les axones constituent les fibres grimpantes) ont été effectuées chez ce mutant. Il est possible d'activer antidromiquement ces cellules par stimulation de la surface du cervelet, aussi bien chez les mutants que chez les témoins, ce qui démontre l'existence de fibres grimpantes fonctionnelles chez *staggerer*. Par ailleurs, l'activité spontanée des cellules olivaires chez *staggerer* est significativement inférieure à celle des témoins.

b) Dans un deuxième temps, des enregistrements intracellulaires de bonne qualité ont été obtenus à partir des cellules de Purkinje chez le mutant *staggerer* (Mariani et Changeux, 1980). Pour près de 75 % des cellules enregistrées, les potentiels post-synaptiques évoqués par stimulation des fibres grimpantes ont une amplitude graduée par paliers au lieu du caractère tout-ou-rien des cellules monoinnervées chez les témoins. En outre, seuls certains des paliers atteignent le niveau de décharge du potentiel d'action : dans ce cas une réponse de fibre grimpante typique est obtenue.

Ces résultats démontrent que les synapses existant entre fibres grimpantes et cellules de Purkinje chez le mutant *staggerer* sont fonctionnelles et que la grande majorité des cellules de Purkinje sont multiinnervées par les fibres grimpantes.

### C) ÉTUDE ÉLECTROPHYSIOLOGIQUE ET PHARMACOLOGIQUE DE NEURONES CÉRÉBELLEUX SUR UN SYSTÈME DE COUPES MAINTENUES EN SURVIE IN VITRO

Cette préparation *in vitro* semble en effet très favorable pour étudier la pharmacologie des neurones centraux chez l'adulte et au cours du développement (Yamamoto et McIlwain, 1966). Cette année, la mise au point de cette technique a été effectuée au laboratoire en collaboration avec Pierre Benoit. Des coupes sagittales de 200-300  $\mu$  d'épaisseur sont rapidement effectuées à l'aide d'un vibratome et placées dans une chambre thermostatée, dans une atmosphère saturée d'un mélange 95 % O<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub>, et perfusée par une solution physiologique oxygénée. Des enregistrements unitaires extracellulaires, puis intracellulaires, de l'activité évoquée et spontanée ont été obtenus pendant plusieurs heures à partir des cellules de Purkinje sur ces coupes. Ces enregistrements permettront donc de débiter l'étude pharmacologique.

#### LISTE DES PUBLICATIONS PARUES EN 1979-1980

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 N.Y., 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 et London, 489-505, Nobel Foundation Symposium, 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).

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* (*FEBS Lett.*, 104, 99-105, 1979).

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

J.P. CHANGEUX, *Molecular interactions in adult and developing neuromuscular junction* (In *The Neurosciences*, Fourth Study Program. The MIT Press, Cambridge et London, 749-778, 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 et F. Clementi, ed., Raven Press, 231-235, 1979).

A. SOBEL, J. HOFER, T. HEIDMANN et J.P. CHANGEUX, *Structural and functional properties of the acetylcholine-regulator* (In *Developments in cell biology*, vol. 4. *Physical chemical aspects of cell surface events in cellular regulation*, C. De Lisi et R. Blumenthal, ed., Elsevier North Holland, 9-27, 1979).

A. SOBEL, J. HOFER, T. HEIDMANN et J.P. CHANGEUX, *Structural and functional properties of the acetylcholine-regulator* (In *Advance in cytopharmacology*, vol. 3. *Neurotoxins : tools in neurobiology*, B. Ceccarelli et F. Clementi, ed., Raven Press, 190-196, 1979).

C. BON, J.P. CHANGEUX, T.W. JENG et H. FRAENKEL-CONRAT, *Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits* (*Eur. J. Biochem.*, 99, 471-481, 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.*, 72, 308-319, 1979).

P.L. WOODHAMS, J. MALLET, J.P. CHANGEUX et R. BALASZ, *Immunological studies on the Purkinje cells from rat and mouse cerebella. II. Immunohistochemical specificity of the antiserum to Purkinje cells* (*Develop. Biol.*, 72, 320-326, 1979).

J.P. CHANGEUX, *Déterminisme génétique et épigénèse des réseaux de neurones : existe-t-il un compromis biologique possible entre Chomsky et Piaget ?* (Extrait de *Théories du Langage, Théories de l'Apprentissage*, Centre Royaumont pour une Science de l'homme. Editions du Seuil, 276-289, 1979).

J.P. CHANGEUX, *Les expériences de Claude Bernard sur le curare et les données actuelles sur la transmission synaptique cholinergique* (Extrait de *La transmission neuromusculaire. Les Médiateurs et le « milieu intérieur »*, Fondation Singer-Polignac, Masson, 71-87, 1980).

T. SAITOH, L.P. WENNOGLE et J.P. CHANGEUX, *Factors regulating the susceptibility of the acetylcholine receptor protein to heat inactivation* (*FEBS Lett.*, 108, 489-494, 1979).

C. GOULON, B. ESTOURNET, A. SOBEL et M. GOULON, *Myasthénie : étude physiopathologique et clinique* (*Rev. Prat.*, Paris, 29, N° 35, 2774-2786, 1979).

J.P. CHANGEUX, *Claude Bernard's experiments on curare and motor endplate synaptic transmission* (In *Claude Bernard and the internal environment - a memorial symposium*, E.D. Robins, ed, Marcel Dekker Inc. New York, Basel, 73-95, 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* (*Develop. Neurosciences*, 2, 254-275, 1979).

A. SOBEL, T. HEIDMANN, J. CARTAUD et J.P. CHANGEUX, *Reconstitution of a functional acetylcholine receptor : polypeptide chains, ultrastructure, and binding for acetylcholine and local anesthetics* (*Eur. J. Biochem.*, 110, 13-33, 1980).

T. HEIDMANN, A. SOBEL, J.L. POPOT et J.P. CHANGEUX, *Reconstitution of a functional acetylcholine receptor : conservation of the conformational and allosteric transitions and recovery of the permeability response ; role of lipids* (*Eur. J. Biochem.*, 110, 35-55, 1980).

J. BETZ, J.F. BOURGEOIS et J.P. CHANGEUX, *Evolution of cholinergic proteins in developing slow and fast skeletal muscles from chick embryo* (*J. Physiol.*, Lond., 301, 197-218, 1980).

J. MARIANI, B. MATON et S. BOUISSET, *Force gradation and motor unit activity during voluntary movements in man (EEG and Clinical Neurophysiol.*, 48, 573-582, 1980).

J. MARIANI et J.P. CHANGEUX, *Multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the cerebellum of the adult staggerer mutant mouse* (*Journal of Neurobiology*, 11, 41-50, 1980).

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.*, 76, 384-395, 1980).

J. MARIANI, *Electrophysiological study of inferior olivary neurons in staggerer mutant mice* (*Exp. Brain Research*, 38, 463-468, 1980).

T. SAITOH et J.P. CHANGEUX, *In vitro phosphorylation of membranes fragments from Torpedo marmorata electric organ : effect on membrane solubilization by detergents* (*Eur. J. Biochem.*, 105, 51-62, 1980).

L.P. WENNOGLE et J.P. CHANGEUX, *Transmembrane orientation of proteins present in acetylcholine receptor-rich membranes from Torpedo marmorata studied by selective proteolysis* (*Eur. J. Biochem.*, 106, 381-393, 1980).

G. WAKSMAN, J.P. CHANGEUX et B. ROQUES, *Structural requirements for agonist and non-competitive blocking action of acylcholine derivatives on Electrophorus electricus electroplaque* (*Mol. Pharmacol.*, 18, 20-27, 1980).

J. GIRAUDAT et J.P. CHANGEUX, *The acetylcholine receptor* (*Trends in Pharmacological Sciences*, 1, 198-202, 1980).

G. WAKSMAN, R. OSWALD, J.P. CHANGEUX et B.P. ROQUES, *Synthesis and pharmacological activity on Electrophorus electricus electroplaque of photo-affinity labelling derivatives of the non-competitive blockers di- and trimethisoquin* (*FEBS Lett.*, 111, N° 1, 23-28, 1980).

R. OSWALD, A. SOBEL, G. WAKSMAN, B. ROQUES et J.P. CHANGEUX, *Selective labelling by <sup>3</sup>H-trimethisoquin azide of polypeptide chains present in acetylcholine receptor-rich membranes from Torpedo marmorata* (*FEBS Lett.*, 111, N° 1, 29-34, 1980).

T. HEIDMANN, A. SOBEL et J.P. CHANGEUX, *Conservation of the kinetic and allosteric properties of the acetylcholine receptor in its Na cholate soluble 9 S form : effect of lipids* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 93, N° 1, 127-133, 1980).

P.L. WOODHAMS, J. COHEN, J. MALLET et R. BALAZS, *A preparation enriched in Purkinje cells identified by morphological and immunocytochemical criteria* (*Brains Res.*, soumis, 1980).

J.P. CHANGEUX, *Une thèse avec Jacques Monod : préhistoire des protéines allostériques* (In *Les origines de la biologie moléculaire, un hommage à Jacques Monod*, A. Lwoff et A. Ullmann, Edts., Acad. Press, 197-208, 1980).

T. SAITOH, R. OSWALD, L.P. WENNOGLE et J.P. CHANGEUX, *Conditions for the selective labelling of the 66,000 dalton chain of the acetylcholine receptor by the covalent non-competitive blocker 5-azido-<sup>3</sup>-H-trimethisoquin* (*FEBS Lett.*, 116, 30-36, 1980).

C.E. HENDERSON, M. HUCHET et J.P. CHANGEUX, *Neurite outgrowth from embryonic chicken spinal neurons is promoted by media conditioned by muscle cells* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, soumis, 1980).

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

Jean-Pierre CHANGEUX :

— Journées d'étude sur « Les applications physiologiques, pharmacologiques et pathologiques de l'étude des récepteurs hormonaux » organisées par l'Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires, Paris, 22 et 23 mars 1979.

— Conférence au Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, Dortmund (R.F.A.), avril 1979.

— Workshop « Cell lineage, stem cells and cell determination », Seillac/Blois, France, 20-24 mai 1979.

— First International Colloquium on Receptors, Capri (Italie), mai 1979.

— Séminaire Université de Zurich (Suisse), juin 1979.

— Séminaire au State University of New York, Buffalo (U.S.A.), juillet 1979.

— XIth International Congress of Biochemistry, Toronto (Canada), juillet 1979.

— Conférence Internationale de l'Institut de la Vie : « De la Physique Théorique à la Biologie », Vienne (Autriche), juillet 1979.

— Workshop E.M.B.O., Nice (France), 24-27 juillet 1979.

— Ecole d'été de Physique Théorique, Les Houches (France), 28-30 août 1979.

— III European Neurosciences Meeting, Rome (Italie), septembre 1979.

— Symposium C.N.R.S., Paris (France), septembre 1979.

— 36th Stated Meeting Neurosciences Research Program, Boston (U.S.A.), octobre 1979.

— Conférence et Cours au Karolinska Institute, Stockholm (Suède), novembre 1979.

Anne DEVILLERS-THIERY :

— III European Neurosciences Meeting, Rome (Italie), septembre 1979.

Christopher HENDERSON :

— International School of Biophysics : « Neural Development », Erice, Sicile (Italie), mai 1979.

— E.M.B.O. Workshop on specific growth factors, Rome (Italie), octobre 1979.

Jacques MALLET :

— 7th International Meeting of the International Society for Neurochemistry, Jerusalem (Israël), septembre 1979.

Pierre BENOIT :

— Colloque C.N.R.S. : « Ontogenesis and Functional mechanisms of peripheral synapses », Paris (France), octobre 1979.

Tsunao SAITOH :

— 7th International Meeting of the International Society for Neurochemistry, Jerusalem (Israël), septembre 1979.

Lawrence WENNOGLE :

— III European Neurosciences Meeting, Rome (Italie), septembre 1979.

DISTINCTIONS

— Chevalier de la Légion d'Honneur, 5 février 1980.

— Membre Correspondant de l'Académie des Sciences (Paris). Discipline :  
Biologie Cellulaire et Moléculaire, 24 mars 1980.

CONFÉRENCES HONORIFIQUES

— Harvey Lecture, New York (U.S.A.), février 1980.

— Wolfgang Pauli Vorlesungen Lecture, Zurich (Suisse), janvier 1980.