

Communications cellulaires

M. Jean-Pierre CHANGEUX, professeur

Le cours n'a pas eu lieu.

RÉSUMÉ DES TRAVAUX DU LABORATOIRE

La recherche a été poursuivie dans notre laboratoire sur cinq thèmes principaux : 1) la structure du récepteur de l'acétylcholine sous forme purifiée en détergent et sous forme membranaire préparé à partir de l'organe électrique de *Torpedo marmorata* et, en particulier, le clonage et la séquence des chaînes de ce récepteur ; 2) les interactions allostériques et transitions conformationnelles du récepteur membranaire ; 3) l'évolution du récepteur de l'acétylcholine au cours de la formation de la synapse et de sa maturation ; 4) l'identification d'une facteur de croissance affectant les neurones de la moelle épinière d'embryon de poulet ; 5) les phénomènes régressifs accompagnant la synaptogénèse dans le cervelet de rat et de souris.

I. STRUCTURE DE LA PROTÉINE RÉCEPTRICE DE L'ACÉTYLCHOLINE

- I.a. *Organisation en sous-unités et propriétés de symétrie des formes légère et lourde du récepteur de l'acétylcholine*
(F. BON *et al.*, 1982, 1983)

La forme légère (L) de la protéine réceptrice de l'acétylcholine d'*Electrophorus* et de *Torpedo* est un pentamère hétérologue de masse moléculaire voisine de 250 000 daltons composé de quatre chaînes polypeptidiques différentes mais homologues avec une stoechiométrie $\alpha_2 \beta \gamma \delta$ (REYNOLDS et KARLIN, 1978 ; LINDSTRØM *et al.*, 1979 ; RAFTERY *et al.*, 1980 ; SAITOH

et al., 1980). Observée par microscopie électronique après coloration négative, la forme légère L se présente sous la forme d'une rosette d'environ 8-9 nm de diamètre avec un puits central qui retient le colorant (CARTAUD *et al.*, 1973 ; NICKEL et POTTER, 1973 ; KLYMKOWSKY et STROUD, 1979 ; ZINGSHEIM *et al.*, 1980). L'extraction du récepteur dans des conditions qui protègent les ponts disulfure, produit une forme lourde (H) de masse moléculaire voisine de 500 000 qui résulte de l'association de deux formes légères L par un pont disulfure intermoléculaire établi entre chaînes δ (SUAREZ-ISLA et HUCHO, 1977 ; CHANG et BOCK, 1977 ; HAMILTON *et al.*, 1978). La forme H peut être identifiée par microscopie électronique à des paires coplanaires (ou « doublets ») de rosettes L (CARTAUD *et al.*, 1980 ; LINDSTRØM *et al.*, 1980 ; WISE *et al.*, 1981 ; KISTLER *et al.*, 1982 ; BARRANTES, 1982).

Cette année, la morphologie fine et les propriétés de symétrie de la forme H ont été étudiées par analyse numérique à partir d'images de microscopie électronique obtenues par contraste négatif à partir de préparations de forme H purifiée et réincorporée dans des vésicules lipidiques de grande taille (BON *et al.*, 1982, 1983). Les densités optiques des images ont été digitalisées à l'aide d'un densitomètre automatique et codées numériquement sous la forme d'un vecteur de 64 termes. Les deux rosettes d'un doublet ont été calées l'une par rapport à l'autre en prenant la valeur minimum de la variance de la distribution des différences entre coordonnées homologues. Il a été trouvé que l'orientation relative des deux rosettes varie dans la population des doublets (66) examinés. Les deux tiers d'entre eux ont un angle de phase voisin de -3° , en d'autres termes, chaque rosette se déduit de l'autre par *translation* (configuration R - R). Dans le reste de la population, l'angle de phase varie avec une moyenne de 164° et une variance de 69° , donc seule une faible fraction des doublets possède la configuration symétrique \mathfrak{R} - R, supposée sans preuve, comme la configuration dominante par les autres groupes (WISE *et al.*, 1981 ; HOLTZMANN *et al.*, 1982 ; ZINGSHEIM *et al.*, 1982). Une variabilité de ce type peut résulter de la flexibilité de l'association entre rosettes au niveau des chaînes δ . Sa présence est en accord avec l'observation que chacun des oligomères de la forme H peut être inactivé par électrons de haute énergie (Lo *et al.*, 1982) et que les propriétés fonctionnelles des formes L et H dans des vésicules de lipide reconstituées ne diffèrent pas de manière significative (ANHOLT *et al.*, 1980).

Les rosettes droites et gauches ont ensuite été orientées dans la même position, mises en phase et additionnées. L'image moyenne de la rosette ainsi obtenue présente les trois sillons précédemment rapportés par d'autres auteurs (ZINGSHEIM *et al.*, 1980 ; KISTLER et STROUD, 1981 ; KISTLER *et al.*, 1982) avec, bien entendu, une amélioration de la résolution. En accord avec l'organisation pentamérique de la forme L, cinq masses inégales peuvent maintenant être distinguées au sein de la rosette. Les deux plus petites (localisées à 13 et 18 heures) ont la distance angulaire trouvée précédemment pour les deux

toxines α biotinylées (HOLTZMANN *et al.*, 1982) et pour les molécules de toxine observées directement (ZINGSHEIM *et al.*, 1982). Elles peuvent donc être identifiées aux chaînes α .

I.b. *Identification de clones cADN codant pour la chaîne α et séquence codante complète du mARN de la chaîne α de T. marmorata* (GIRAUDAT *et al.*, 1982 ; DEVILLERS-THIÉRY *et al.*, 1983)

L'organe électrique de Torpille contient environ 100 fois plus de mARN codant pour les chaînes du récepteur de l'acétylcholine que le muscle (MENDEZ *et al.*, 1980 ; MERLIE *et al.*, 1978). Il a donc été sélectionné comme source pour la purification du messenger. L'ARN purifié à partir de l'organe électrique de *T. marmorata* a été utilisé pour construire une banque de cADN. Les clones cADN codant pour la chaîne α du récepteur de l'acétylcholine ont été identifiés par une sélection en deux étapes parmi 700 clones recombinants. Le récepteur de l'acétylcholine est présent dans l'organe électrique mais pas dans le foie ou la rate de Torpille. Les clones ont donc été choisis pour leur faculté d'hybrider avec le cADN P³² complémentaire du mARN de l'organe électrique mais pas avec les cADN P³² complémentaires du mARN de foie ou de rate. 46 clones ont été retenus sur cette base. Parmi eux, 12 hybridaient fortement avec des cADN P³² complémentaires d'une fraction mARN enrichie en mARN du récepteur et ont été étudiés plus avant. Ensuite, l'aptitude des insertions des cADN à hybrider le mARN de la chaîne α a été appréciée en suivant la traduction du mARN hybridé dans le système acellulaire du lysat de reticulocytes.

L'insertion cADN de deux clones α -1 et α -2 a été trouvée hybrider sélectivement avec une espèce de mARN qui détermine la synthèse *in vitro* d'un polypeptide de masse moléculaire 38 000. Ce polypeptide était précipité par 1) un sérum de lapin dirigé contre la chaîne α purifiée dénaturée (la chaîne α pure déplace le complexe immun) ; 2) un anticorps monoclonal de rat spécifique de la chaîne α dénaturée (n° 5 de TZARTOS et LINDSTRØM, 1980). Elle a donc été identifiée comme précurseur de la chaîne α . Donc, cette année, deux clones α -1 et α -2 codant pour la chaîne α du récepteur de l'acétylcholine ont été isolés (GIRAUDAT *et al.*, 1982 ; DEVILLERS-THIÉRY *et al.*, 1983).

Le mARN codant pour la chaîne α a été caractérisé par hybridation de l'ARN polyadénylé d'organe électrique de Torpille avec la sonde α -1. L'espèce identifiée est longue de 2 kilobases (GIRAUDAT *et al.*, 1982).

Concurremment, des clones cADN codant pour la chaîne γ du récepteur de *T. californica* ont été isolés (BALLIVET *et al.*, 1982). Par la suite, des publications sur l'isolement de clones codant pour la chaîne α de *T. marmorata*

(SUMIKAWA *et al.*, 1982) et *T. californica* (NODA *et al.*, 1982) ont paru. Celles-ci contenaient des données de séquence partielle (à partir de *T. marmorata* ; SUMIKAWA *et al.*, 1982) ou complète (à partir de *T. californica* ; NODA *et al.*, 1982) sur la chaîne α .

Entre-temps, nous avons établi la première séquence codante complète du mARN de la chaîne α du récepteur de l'acétylcholine de *T. marmorata* (DEVILLERS-THIÉRY *et al.*, 1983) à partir des insertions cADN des clones $\text{p}\alpha$ -1 (550 paires de base) et $\text{p}\alpha$ -2 (1 350 paires de base). Ces deux cADN chevauchent sur une longueur de 270 paires de base et représentent donc, placés bout à bout, une séquence unique de 1 828 paires de base, taille proche de celle du mARN. La séquence codante est longue de 1 383 nucléotides et est flanquée de 76 nucléotides sur la région 5' non transcrite et de 369 sur la région 3' non transcrite.

La séquence complète de la chaîne α est longue de 461 acides aminés. Elle contient la séquence N-terminale de la chaîne α déterminée pour la première fois par méthode chimique par DEVILLERS-THIÉRY *et al.*, (1979) (et confirmée par la suite par RAFTERY *et al.*, 1980). Précédant cette séquence, 24 acides aminés correspondent à la séquence signal clivable. La sous-unité mature est donc composée de 437 acides aminés, ce qui donne un poids moléculaire de 50 200 daltons, significativement plus grande que celle estimée par électrophorèse de la chaîne α sur gels SDS (KARLIN, 1980). Plusieurs différences de nucléotides existent entre les mARN de *T. californica* et *T. marmorata*. Des 11 mutations dans la région codante, cinq sont silencieuses et six introduisent des modifications dans la séquence d'acides aminés. Quatre d'entre elles ne changent pas le caractère hydrophile *versus* hydrophobe des résidus.

L'examen de la séquence d'acides aminés nous a conduit à proposer un modèle hypothétique de l'organisation transmembranaire de la chaîne α (DEVILLERS-THIÉRY *et al.*, 1983). La séquence peut être subdivisée en quatre domaines : deux hydrophiles (résidus 1 - 209 et 299 - 408) et deux hydrophobes (résidus 210 - 298 et 409 - 437). Dans les domaines hydrophobes, quatre séquences d'environ 20 acides aminés hydrophobes consécutifs possèdent les traits caractéristiques des segments qui, dans plusieurs protéines membranaires bien connues, traversent la double couche lipidique sous la forme d'hélice α . Dans ces conditions, la chaîne polypeptidique traverserait la double couche lipidique quatre fois. La chaîne a été orientée vis-à-vis des faces synaptique ou cytoplasmique de la membrane sous-synaptique sur la base de l'observation de WENNOGLE et CHANGEUX (1980) que la protéolyse par la trypsine a lieu sur la face cytoplasmique de la membrane près de la séquence C-terminale de la chaîne. De tels sites de clivage sont effectivement présents sur le fragment hydrophile (301 - 408) qui contient 14 résidus lysine et arginine. Celui-ci se trouve donc du côté cytoplasmique. Dans ces conditions, le premier grand domaine hydrophile (1 - 209) se trouverait du côté de la

fente synaptique et porterait donc le site récepteur de l'acétylcholine et les résidus glycosylés. Des quatre hélices la troisième a un caractère unique. Elle présente en trois dimensions une ligne verticale de résidus polaires (Tyr 277, Thr 281, Ser 288, Thr 292, His 299) qui, en association avec d'autres structures similaires présentes sur d'autres sous-unités, pourrait former un canal transmembranaire hydrophile. Ce canal pourrait participer au fonctionnement de l'ionophore mais les domaines « extrinsèques » synaptiques ou cytoplasmiques pourraient aussi être engagées dans la sélectivité ionique.

I.c. *Restauration de la liaison de haute affinité d' α -bungarotoxine par la chaîne α purifiée*

(TZARTOS et CHANGEUX, 1983)

Dans le but d'identifier les éléments de structure du récepteur de l'acétylcholine impliqués dans la liaison des ligands cholinergiques et dans la régulation de la translocation ionique, des tentatives ont été effectuées de récupérer quelques-unes de ces propriétés à partir des sous-unités isolées. MEUNIER *et al.* (1972) mentionnaient déjà que la capacité de lier les α -toxines de serpent pouvait être conservée après dispersion par le SDS du récepteur d'*Electrophorus* en unités de plus petit poids moléculaire. HAGGERTY et FROEHNER (1981) ont aussi montré que la sous-unité α purifiée en présence de SDS lie l' α -bungarotoxine avec une constante de dissociation de l'ordre de 0,2 μ M après élimination du SDS.

Cette année, des conditions ont été définies suivant lesquelles la chaîne α purifiée par électrophorèse en gel d'acrylamide en SDS lie 125 I- α -bungarotoxine avec une haute affinité ($K_D \sim 3$ nM). Dans ces conditions, on récupère 100 % des sites. De manière inattendue, il a été découvert que des faibles concentrations de SDS ($\sim 0,02$ %) sont essentielles pour la récupération de la liaison d' α -bungarotoxine de haute affinité, mais que des détergents non dénaturants (par exemple, cholate de sodium, Triton X-100) ont un effet inhibiteur puissant. La toxine se lie à la sous-unité purifiée et aux peptides de 34 000 et 27 000 daltons obtenus par traitement à la papaïne mais pas aux peptides de 14 000 daltons ainsi qu'aux sous-unités β , γ ou δ . Les toxines non marquées déplacent l' α -bungarotoxine marquée et de toutes celles-ci, l' α -bungarotoxine est la plus efficace. Le décéméthonium et l'hexaméthonium entrent en compétition efficacement avec 125 I- α -bungarotoxine mais la carbamylcholine n'a qu'un effet très faible. Des anticorps monoclonaux conformation-dépendents dirigés contre la région immunologique principale de la chaîne α se lient au complexe α -bungarotoxine - chaîne α mais d'une manière moins efficace que sur le récepteur intact. La chaîne α isolée en SDS a donc récupéré, au moins en partie, plusieurs propriétés structurales et de liaison de la chaîne α caractéristique de la molécule oligomérique dans son état natif (TZARTOS et CHANGEUX, 1982, 1983).

I.d. *Rôles des chaînes α , β , γ et δ dans l'oligomère natif*

(OSWALD et CHANGEUX, 1982 ; HEIDMANN *et al.*, 1982, 1983)

Le rôle respectif de chacune des quatre chaînes du récepteur de l'acétylcholine n'est pas encore complètement connu. Peu d'ambiguïté existe au sujet de la chaîne α qui est marquée par des réactifs d'affinité spécifiques du récepteur de l'acétylcholine (revue par KARLIN, 1980), par des dérivés photolabiles de l' α -bungarotoxine (WITZEMANN *et al.*, 1979) ou par une α -bungarotoxine radioactive à laquelle on a ajouté des agents pontants bifonctionnels (HAMILTON *et al.*, 1978 ; KARLIN *et al.*, 1979) et porte donc tout ou partie du site récepteur. Toutefois, la dernière série d'expériences qui vient d'être mentionnée, révélait une participation de la chaîne δ , et dans une moindre mesure, des chaînes β et γ à la liaison de l' α -bungarotoxine.

Cette année, la participation des différentes chaînes du récepteur de l'acétylcholine à la liaison d' α -bungarotoxine a été étudiée par simple irradiation U.V. (OSWALD et CHANGEUX, 1982). Des conditions ont été définies pour le pontage de ^{125}I - α -bungarotoxine au récepteur de l'acétylcholine sans la complication de bras « pontants ». Un marquage élevé de la chaîne δ et des chaînes β et γ a été observé. Donc, le site de liaison de chaque molécule de ^{125}I - α -bungarotoxine chevauche sur la chaîne α et sur une sous-unité voisine (par exemple, la chaîne γ ou la chaîne δ). Cette interprétation est en accord avec l'observation que les deux sites de liaison de l'acétylcholine et de l' α -toxine présents par molécule de récepteur possèdent des propriétés différentes (revue dans SINE et TAYLOR, 1980).

Chez *T. marmorata*, la chaîne δ réagit de manière covalente avec un dérivé de photoaffinité du bloquant non-compétitif : triméthisoquin (OSWALD *et al.*, 1980) ainsi qu'avec d'autres bloquants non-compétitifs (par exemple, la phencyclidine, l'histrionicotoxine) par simple irradiation U.V. (OSWALD et CHANGEUX, 1981). Un autre bloquant non compétitif, la ^3H -chlorpromazine, marque les trois autres chaînes en plus de la chaîne δ (OSWALD et CHANGEUX, 1981).

Cette année, des tentatives ont été effectuées pour distinguer entre deux interprétations possibles de ce résultat : ou bien le site de liaison pour la ^3H -chlorpromazine est commun aux quatre chaînes, ou bien chaque chaîne porte un site pour la ^3H -chlorpromazine. Des études de liaison à l'équilibre de la ^3H -chlorpromazine ont montré qu'il existe un site unique pour ce ligand par forme L du récepteur de l'acétylcholine qui, comme le marquage des chaînes, est sensible à la toxine de grenouille, histrionicotoxine (HEIDMANN *et al.*, 1982, 1983). Il existe donc un seul site de chlorpromazine, commun aux quatre types de sous-unités par molécule de récepteur d'acétylcholine. Ce site est situé vraisemblablement dans la dépression centrale de la molécule et, en accord avec le modèle présenté ci-dessus (§ I.b), peut faire partie du canal ionique.

II. INTERACTIONS ALLOSTÉRIQUES ET TRANSITIONS CONFORMATIONNELLES DU RÉCEPTEUR DE L'ACÉTYLCHOLINE LIÉ A LA MEMBRANE

II.a. Sites allostériques des bloquants non-compétitifs

(HEIDMANN *et al.*, 1982, 1983)

L'effet des bloquants non-compétitifs sur les transitions conformationnelles du récepteur de l'acétylcholine membranaire a été étudié dans ce laboratoire par des méthodes de cinétique rapide en utilisant l'agoniste fluorescent Dns-C₆-Cho (WAKSMAN *et al.*, 1976, 1980 ; HEIDMANN et CHANGEUX, 1979). Tous ces produits règlent l'affinité du site de liaison de l'acétylcholine d'une manière allostérique et stabilisent avec une plus ou moins grande ampleur l'état de haute affinité désensibilisé du récepteur, même en l'absence d'agoniste (références dans HEIDMANN et CHANGEUX, 1979 ; COHEN *et al.*, 1980 ; ELDEFRAWI *et al.*, 1981 ; ARONSTAM *et al.*, 1981 ; DUNN *et al.*, 1981 ; YOUNG et SIGMAN, 1981).

Cette année, les divers sites d'action pour les bloquants non compétitifs sur le récepteur membranaire ont été étudiés en effectuant, en parallèle, deux séries de mesure : 1) la liaison à l'équilibre d'un spectre très large de bloquants non-compétitifs radioactifs ; 2) le déplacement de l'équilibre conformationnel en faveur de l'état de haute affinité pour les agonistes. En résumé, les bloquants non compétitifs règlent les transitions allostériques du récepteur de l'acétylcholine au niveau d'au moins trois catégories de sites distincts : 1) les sites-récepteurs de l'acétylcholine proprement dits, sur lesquels ils se lient avec une faible affinité de manière sensible aux agonistes et antagonistes cholinergiques ; 2) les sites de « haute affinité » présents à un seul exemplaire par forme L du récepteur d'où les bloquants non-compétitifs sont déplacés par l'histrionicotoxine ; 3) des sites de « faible affinité » présents en grand nombre (10 à 20 par forme L du récepteur) et insensibles à l'histrionicotoxine. Les bloquants non-compétitifs phencyclidine, meproadien, le détergent Triton X-100, et, bien entendu, l'histrionicotoxine se lient de manière préférentielle au site de haute affinité tandis que les autres comme le triméthisoquin se lient sur les sites de faible affinité (HEIDMANN *et al.*, 1982, 1983).

Les expériences de reconstitution montrent que le nombre des sites de faible affinité dépend du rapport lipide-protéine suggérant que ces sites peuvent être situés à l'interface de la protéine réceptrice avec la double couche lipidique. D'autre part, le site de haute affinité, comme cela a été discuté aux § I.b et I.d, peut être situé au niveau d'un canal central commun à toutes les chaînes du récepteur (HEIDMANN *et al.*, 1982, 1983).

II.b. *Transitions conformationnelles du récepteur de l'acétylcholine membranaire suivies à l'aide de phencyclidine (H³)*
(OSWALD *et al.*, 1983)

Par le passé, à l'exception du travail d'ELDEFRAWI *et al.* (1980) et d'ARONSTAM *et al.* (1981) avec la perhydrohistrionicotoxine, les cinétiques des transitions conformationnelles du récepteur membranaire ont été le plus souvent suivies avec des ligands spécifiques du site récepteur de l'acétylcholine (HEIDMANN et CHANGEUX, 1979 ; NEUBIG et COHEN, 1980) ou avec des composés dont le mode d'action est inconnu (DUNN *et al.*, 1981). Cette année, la (H³)-phencyclidine a été sélectionnée comme ligand pour suivre les transitions conformationnelles du récepteur membranaire. Ces cinétiques de liaison sur le site de haute affinité des bloquants non-compétitifs ont été suivies par une méthode de filtration rapide.

Quand les fragments de membrane sont équilibrés avec la carbamylcholine avec l'addition de (H³)-phencyclidine, les constantes de vitesse d'association et de dissociation de (H³)-phencyclidine s'accroissent respectivement de $1,22 \pm 0,05$ à $7,2 \pm 0,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ et de $7,5 \pm 0,1$ à $9,8 \pm 0,7 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$. D'autre part, la préincubation avec l'érabutoxine diminue ces deux vitesses par un facteur d'environ 2 par rapport à la valeur observée en l'absence d'effecteur. Quand la carbamylcholine est ajoutée aux fragments de membrane riches en récepteur en même temps que la (H³)-phencyclidine, les vitesses d'association de (H³)-phencyclidine s'accroissent de 10^3 à 10^4 fois et les vitesses de dissociation de 4 à 10 fois. Ces effets ne sont pas observés avec l'antagoniste compétitif d-tubocurarine.

Ces données ont été interprétées en termes d'un modèle à quatre états des transitions allostériques du récepteur de l'acétylcholine (NEUBIG et COHEN, 1980 ; HEIDMANN et CHANGEUX, 1980) où D est un état de haute affinité lentement désensibilisé, I un état intermédiaire rapidement désensibilisé et A un état actif, seul état pour lequel le canal ionique est ouvert. Les constantes de vitesse de l'interaction de (H³)-phencyclidine avec ces différentes conformations du récepteur ont été mesurées. Les résultats suggèrent que, en plus de la stabilisation de l'état D, la phencyclidine se lie avec une vitesse très rapide à l'état A où le canal est ouvert et accélère la transition vers l'état I (OSWALD *et al.*, 1983).

II.c. *Un modèle de « mémoire à court terme »*
(HEIDMANN et CHANGEUX, 1982)

En dépit du fait que la désensibilisation est une propriété très générale des récepteurs de neurotransmetteurs, sa signification physiologique est encore énigmatique. L'idée qu'elle puisse contribuer à la régulation de l'efficacité

synaptique, et donc qu'elle est concernée par des processus de mémoire à court terme (voir CHANGEUX, 1981) a été développée sur des bases formelles (HEIDMANN et CHANGEUX, 1982). L'hypothèse proposée est que le rapport état de repos / état désensibilisé déterminerait l'efficacité de la synapse. Expérimentalement, ce rapport pouvait être réglé par le potentiel de membrane, par des ligands se fixant sur le site agoniste et/ou sur les sites allostériques (présents sur la molécule de récepteur). Dans ces conditions, l'état d'activité des synapses voisines (qui se manifeste par exemple par des variations de potentiel de membrane, par l'accumulation (Ca^{++}) ou la production (nucléotides cycliques) d'effecteurs allostériques, etc.) pourrait régler l'efficacité de la synapse considérée en changeant la balance état de repos / état désensibilisé. La constante de vitesse de cette transition serait suffisamment lente pour introduire des « traces » à court terme au niveau des synapses. Le modèle a été mis en équation et le cas du « conditionnement classique » et de la « synapse de Hebb » simulés sur ordinateur (HEIDMANN et CHANGEUX, 1982).

III. ÉVOLUTION DU RÉCEPTEUR DE L'ACÉTYLCHOLINE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DE LA SYNAPSE

Dans la synapse électromotrice et la jonction neuromusculaire adulte, le récepteur de l'acétylcholine forme des agrégats immobiles et denses, son temps de demi-vie métabolique est supérieur à 10 jours, et le temps d'ouverture moyen du canal ionique environ 1 msec. Par contre, dans l'embryon, avant l'arrivée des axones moteurs, le récepteur de l'acétylcholine est réparti de manière diffuse, il est animé d'un mouvement de translation et de rotation rapide, son temps de demi-vie métabolique est de 18 heures, et dans certains systèmes, le temps d'ouverture du canal ionique plus long (3 - 5 msec.) (revue dans FAMBROUGH, 1979 ; CHANGEUX, 1981). Les différences notées entre ces deux types de récepteur peuvent être *intrinsèques* (différents gènes exprimés, modifications covalentes) ou *extrinsèques* (différents environnements membranaires et/ou interactions avec des protéines périphériques associées au cytosquelette ou à la lame basale).

III.a. *Utilisation d'anticorps monoclonaux dans la mise en évidence de différences intrinsèques entre récepteurs embryonnaire et adulte* (HOLTON, TZARTOS et CHANGEUX, 1983)

Cette année, les anticorps monoclonaux développés par TZARTOS et LINDSTRØM (1980) contre le récepteur de *T. californica* ont été utilisés pour détecter des différences éventuelles de structure primaire ou de conformation

entre les récepteurs embryonnaire et adulte de *T. marmorata*. Une banque de 58 anticorps spécifiques des sous-unités du récepteur a été employée. Avec les anticorps anti-chaîne α , aucune différence n'a été notée. Par contre, avec les anticorps anti- β , γ et δ , des différences apparentes ont d'abord été remarquées. En réalité, ces anticorps distinguent entre les formes L et H du récepteur : ils réagissent plus efficacement avec la forme H qu'avec la forme L. Dans les conditions expérimentales employées, la forme L paraît plus abondante dans l'embryon que chez l'adulte. Après dissociation complète de la forme lourde en forme légère par le β -mercaptoéthanol, aucune différence n'a été décelée avec tous les anticorps étudiés. La variation du rapport entre formes légère et lourde elle-même disparaît après extraction du récepteur en présence de N-éthylmaleimide. Les changements de structure primaire et/ou de conformation de la molécule de récepteur qui ont lieu au cours du développement, sont donc très faibles ou inexistantes.

III.b. *Rôle de la protéine 43 000 v_1 dans l'immobilisation de la protéine réceptrice de l'acétylcholine*

(ROUSSELET *et al.*, 1982)

Les protéines 43 000 (SOBEL *et al.*, 1977, 1978) constituent un groupe de polypeptides distincts du récepteur mais étroitement associés à celui-ci dans la membrane sous-synaptique. L'élimination de ces protéines par bref traitement à pH 11 conserve les propriétés fonctionnelles du récepteur qui est encore membranaire (NEUBIG *et al.*, 1979) mais accroît la susceptibilité de celui-ci à l'inactivation thermique (SAITOH *et al.*, 1979) et à la digestion par des enzymes protéolytiques (KLYMKOWSKY *et al.*, 1980). De plus, le mouvement de rotation de la protéine réceptrice étiquetée par une maléimide marqueur de spin s'accroît de manière remarquable après élimination de la protéine 43 000 (ROUSSELET *et al.*, 1979). Cette ou ces protéine(s) joue(nt) un rôle « structural » dans la membrane sous-synaptique. Ce rôle de la protéine 43 000 dans l'immobilisation du récepteur a été récemment mis en question par BARTHOLDI *et al.* (1981) qui n'ont détecté des changements dans le mouvement du récepteur marqué par une toxine phosphorescente seulement à haute température.

Cette année, ce problème a été réexaminé avec une α -bungarotoxine portant un marqueur de spin. Le spectre de l' α -bungarotoxine marquée liée aux fragments de membranes riches en récepteur révèle une forte immobilisation. La réduction de la membrane par le dithiothreitol a peu d'effet sur le mouvement. Confirmant les résultats de ROUSSELET *et al.* (1979), l'extraction à pH 11 accroît les mouvements de rotation de la protéine réceptrice, et comme cela a été observé en microscopie électronique, permet également sa diffusion latérale dans le plan des fragments de membranes (ROUSSELET *et al.*, 1982).

III.c. *Existence d'un squelette dans les fragments de membranes riches en récepteur de l'acétylcholine*

(CARTAUD *et al.*, 1982)

L'analyse en gel à deux dimensions des protéines 43 000 révèle trois formes isoélectriques (SAITOH et CHANGEUX, 1980) qui ont été appelées v_1 , v_2 et v_3 par GYSIN *et al.* (1981). De ces trois formes, seule v_1 paraît attachée solidement à la membrane après purification. Dans le but d'observer cette protéine par microscopie électronique, des tentatives ont été effectuées de fixer cette membrane avec divers réactifs. L'un d'eux, le bromure de para-azido-phénacyl (PAB) réagit par une extrémité avec les nombreux groupes SH présents sur v_1 et par l'autre extrémité, après irradiation U.V., avec les chaînes latérales d'acides aminés voisines. Après pontage par le PAB, v_1 disparaît des gels à deux dimensions tandis que v_2 et v_3 persistent. La même préparation examinée par microscope électronique révèle, après extraction par le Triton X-100, des filaments de taille « intermédiaire » (de 5 à 18 nm) décorés de place en place par des rosettes de récepteur. Très certainement, v_1 est un composant du squelette de cette membrane. Puisque v_1 est présent seulement sur la face interne des fragments de membranes (WENNOGLE et CHANGEUX, 1981 ; SAINT-JOHN *et al.*, 1982), ce squelette devrait être associé à la face cytoplasmique de la membrane sous-synaptique.

IV. *IDENTIFICATION DE FACTEURS STIMULANT LA CROISSANCE DES NEURITES A PARTIR DE NEURONES DE MOELLE ÉPINIÈRE D'EMBRYON DE POULET*

(HENDERSON, 1983 ; HENDERSON *et al.*, 1983 a, b)

Des « facteurs rétrogrades » libérés par des cellules musculaires ont été supposés jouer un rôle dans la croissance et la stabilisation sélective des axones moteurs au cours de la mise en place de l'innervation adulte (CHANGEUX et DANCHIN, 1976 ; VARON et BUNGE, 1978 ; HENDERSON, 1983). Il a été montré qu'un milieu conditionné par les cellules musculaires provoque l'extension de neurites à partir de cellules en culture dissociées à partir de tube neural d'embryon de poulet de 4 à 5 jours (HENDERSON *et al.*, 1981).

Cette année, la recherche d'une source de facteur suffisamment riche pour mener à bien la purification a conduit à la découverte que des *extraits* de muscles de poulet contiennent le facteur de croissance (HENDERSON *et al.*, 1983 a, b). Quand des poulets de 6 jours sont dénervés par section du nerf sciatique, l'activité spécifique du facteur s'accroît en moyenne 15 fois trois jours après la dénervation. La production de ce facteur est donc réglée par

l'innervation du muscle. En plus de ses implications théoriques, cette observation est d'un intérêt pratique puisqu'elle fournit une grande quantité de facteur disponible pour la purification (HENDERSON *et al.*, 1983 a).

Finalement, un modèle de régulation de l'innervation du muscle pendant le développement a été proposé sur la base de la capture sélective de facteurs rétrogrades musculaires par les axones moteurs en développement (GOUZÉ *et al.*, 1983). A un stade critique du développement, plusieurs axones convergent à partir de neurones moteurs différents vers chaque plaque motrice. Par la suite, une seule terminaison nerveuse par fibre musculaire est stabilisée. Il est supposé que 1) cette stabilisation sélective résulte de la compétition des terminaisons nerveuses pour un stock limité de facteur rétrograde ; 2) l'activité des fibres nerveuses afférentes règle l'« utilisation » de ce facteur dans l'évolution de la terminaison nerveuse qui devient stable au-delà d'un seuil. La ségrégation des unités motrices de taille fixe a été simulée sur ordinateur à partir des équations du modèle. Les prédictions expérimentales du modèle peuvent désormais être mises à l'épreuve.

V. *ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT SYNAPTIQUE SUR LE CERVELET*
(MARIANI, 1982 ; MARIANI, 1983 ; BENOÎT et MARIANI, 1982 ; MULLE, 1983)

L'étude du phénomène d'élimination synaptique spontanée décrit depuis plusieurs années (revue dans MARIANI, 1983) a été poursuivie.

V.a. *Etendue de la multiinnervation des cellules de Purkinje par les fibres grimpantes chez les mutants weaver, reeler et staggerer*
(MARIANI, 1982)

Dans le cervelet de ces trois mutants, la multiinnervation des cellules de Purkinje par des fibres grimpantes (qui est un processus transitoire du développement normal) persiste à l'état adulte, la régression étant normalement liée à la mise en place d'une autre catégorie de synapses sur les cellules de Purkinje (fibres parallèles - cellules de Purkinje) qui n'a pas lieu normalement chez ces animaux. L'étendue de cette multiintervention résiduelle (nombre moyen de fibres grimpantes par cellules de Purkinje) a été précisée ainsi que les caractéristiques de la décharge du système olivocerebelleux dans ces conditions (MARIANI, 1982) : la multiinnervation résiduelle est de 3,5 fibres par cellule, c'est-à-dire du même ordre que le maximum de la multiinnervation transitoire observé pendant le développement.

V.b. *Etude des projections de la périphérie sur les cellules de Purkinje par la voie des fibres grimpantes : comparaison entre cellules recevant une ou plusieurs fibres grimpantes*

(C. MULLE, B. GEOFFROY, M. SOUDANT, J. MARIANI)

Une étude détaillée de la représentation somatotopique de six stimulations périphériques dans la portion vermiennne des lobules VII et VIII du cervelet normal (où les cellules de Purkinje reçoivent une fibre grimpante) a été effectuée par enregistrements intracellulaires de plusieurs centaines de cellules de Purkinje et a permis de révéler une distribution précise en « microzones » ou « patches » de centaines de ces stimulations.

Une étude comparable a été effectuée chez le rat irradié au cours du développement : la persistance de la multiinnervation à l'état adulte dans ce système permet de l'utiliser comme modèle du développement. L'étude détaillée des réponses et des convergences des réponses suggère qu'au niveau d'organisation étudié (stimulation électrique de la périphérie), la régression de la multiinnervation ne joue pas un rôle majeur dans la ségrégation des zones.

Ce travail sera poursuivi en analysant de manière plus fine la répartition des réponses à des stimulations naturelles d'une modalité sensorielle définie (stimulation des vibrisses).

V.c. *Bases anatomiques de la régression de la multiinnervation grimpante*

(N. DELHAYE-BOUCHAUD, B. GEOFFROY, J. MARIANI)

La question est de savoir si la régression n'affecte que les collatérales d'axones des fibres grimpantes ou si elle s'accompagne d'une mort cellulaire d'une fraction de neurones olivaires (dont les axones forment les fibres grimpantes). Les comptages de neurones olivaires effectués au cours du développement montrent qu'il n'y a pas de mort cellulaire associée à la régression axonale.

V.d. *Etude du mécanisme d'action cellulaire de certains anticonvulsivants*
(P. BENOÎT, J. MARIANI, 1982 et non publié)

L'étude microphysiologique de l'effet de l'acide 1-Méthyl-cyclohexane carboxylique aux propriétés anticonvulsivantes révèle que cet agent entraîne une potentiation de l'inhibition GABAergique intracérébelleuse comme les anticonvulsivants de référence (diazepam) appartenant à d'autres classes pharmacologiques d'anticonvulsivants.

L'analyse d'autres molécules anticonvulsives fournies par la SANOFI (en particulier, la dopakine) est en cours.

PUBLICATIONS DU LABORATOIRE DE COMMUNICATIONS CELLULAIRES

1982

J.L. POPOT, *Functional studies of purified integral membrane proteins reintegrated into lipid vesicles : the case of the acetylcholine receptor* (In : « Méthodologie des Liposomes » (L.D. Leserman and J. Barbet eds.), I.N.S.E.R.M., vol. 107, 93-124 et 147-154, 1982).

C. BON and G. MARLAS, *Relationship between the pharmacological action of crotoxin and its phospholipase activity* (Eur. J. Biochem., 125, 157-165, 1982).

J. GIRAUDAT, A. DEVILLERS-THIÉRY, C. AUFRAY, F. ROUGEON and J.P. CHANGEUX, *Identification of a cDNA clone coding for the acetylcholine binding subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor* (E.M.B.O. J., I, 713-717, 1982).

J.P. BOURGEOIS and M. TOUTANT, *Innervation of avian Latissimus dorsi muscle and axonal outgrowth pattern in the Posterior latissimus dorsi motor nerve during embryonic development* (J. Comp. Neurol., 208, 1-15, 1982).

R. MEINIEL and J.P. BOURGEOIS, *Appearance and distribution in situ of nicotinic acetylcholine receptors in cervical myotomes of young chick embryos* (Anat. Embryol., 164, 349-368, 1982).

J. CARTAUD, R.E. OSWALD, G. CLÉMENT and J.P. CHANGEUX, *Evidence for a skeleton in acetylcholine receptor rich-membranes from Torpedo marmorata electric organ* (F.E.B.S. Lett., 145, 250-257, 1982).

F. BON, E. LEBRUN, J. GOMEL, R. VAN RAPENBUSCH, J. CARTAUD, J.L. POPOT et J.P. CHANGEUX, *Orientation relative des deux oligomères constituant la forme lourde du récepteur de l'acétylcholine chez la Torpille marbrée* (C.R. Acad. Sci. (Paris), 295, 199-205, 1982).

T. HEIDMANN, R.E. OSWALD et J.P. CHANGEUX, *Le site de liaison de haute affinité de la chlorpromazine est présent à un seul exemplaire par molécule de récepteur cholinergique et est commun aux quatre chaînes polypeptidiques* (C.R. Acad. Sci. (Paris), 295, 345-349, 1982).

T. HEIDMANN et J.P. CHANGEUX, *Un modèle moléculaire de régulation d'efficacité d'une synapse chimique au niveau postsynaptique* (C.R. Acad. Sci. (Paris), 295, 665-670, 1982).

P. BENOÎT and J. MARIANI, *Effect of sodium methyl-1-cyclohexane carboxylate on electrical activity of Purkinje cells in rat : evidence for a potentiation of intracerebellar inhibition* (Neuropharmacology, 21, 1239-1244, 1982).

1983

J.L. GUÉNET, C. SOTELO and J. MARIANI, « *Hyperspiny Purkinje cell* », a new neurological mutation in the mouse (*J. Heredity*, 74, 105-108, 1983).

C.E. HENDERSON, *Roles for retrograde factors in synapse formation at the nerve muscle junction* (*Progr. Brain Res.*, 58, 383-392, 1983).

J. MARIANI, *Elimination of synapses during the development of the central nervous system* (*Progr. Brain Res.*, 58, 383-392, 1983).

J.P. CHANGEUX, *Remarks about the singularity of nerve cells and its ontogenesis* (*Progr. Brain Res.*, 58, 465-478, 1983).

J.L. GOUZÉ, M. LASRY and J.P. CHANGEUX, *Selective stabilization of muscle innervation during development : a mathematical model* (*Biol. Cybern.*, 46, 207-215, 1983).

A. DEVILLERS-THIÉRY, J. GIRAUDAT, M. BENTABOULET and J.P. CHANGEUX, *Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding α -subunit from *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor. A model for the transmembrane organization of the polypeptide chain* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 2067-1071, 1983).

T. HEIDMANN, R.E. OSWALD and J.P. CHANGEUX, *Multiple sites of action for noncompetitive blockers on acetylcholine receptor-rich membrane fragments from *Torpedo marmorata** (*Biochemistry*, 22, 3112-3127, 1983).

R.E. OSWALD, T. HEIDMANN and J.P. CHANGEUX, *Multiple affinity for noncompetitive blockers revealed by (^3H) phencyclidine binding to acetylcholine receptor-rich membrane fragments from *Torpedo marmorata** (*Biochemistry*, 22, 3128-3136, 1983).

J.L. POPOT, *Structural and functional properties of the acetylcholine receptor : studies using reconstituted vesicles* (*In* : « The Proceedings of the Symposium : Basic mechanisms of neuronal hyperexcitability » (H.H. Jasper and N.M. Van Gelder, eds.), Montréal, May 1982).

C.E. HENDERSON, M. HUCHET and J.P. CHANGEUX, *Denervation increases the neurite-promoting activity in extracts of skeletal muscle* (*Nature*, 302, 609-611).

C.E. HENDERSON, M. HUCHET and J.P. CHANGEUX, *Two distinct activities affecting neurite outgrowth from embryonic chicken spinal neurons* (*Develop. Biol.*, soumis).

S.J. TZARTOS and J.P. CHANGEUX, *High affinity binding of α -bungarotoxin to the purified subunit and to its 27,000 dalton proteolytic peptide from *Torpedo**

marmorata acetylcholine receptor. Requirement for sodium dodecyl sulfate (*E.M.B.O. J.*, 2, 381-387, 1983).

H.O. NGHIEM, J. CARTAUD, C. DUBREUIL, G. BUTTIN and J.P. CHANGEUX, *Production and characterization of a monoclonal antibody directed against the 43,000 MW γ l polypeptide from Torpedo marmorata electric organ* (*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, sous presse).

F. BON, E. LEBRUN, J. GOMEL, R. VAN RAPPENBUSCH, J. CARTAUD, J.L. POPOT and J.P. CHANGEUX, *Image analysis of the acetylcholine receptor heavy form* (*J. Mol. Biol.*, 1983, soumis).

J.P. CHANGEUX, Discours prononcé lors de la remise du prix Lounsbery (Acad. Sci. Paris et Nat. Acad. Sci. U.S.A.) le 21 juin 1982, *Le récepteur de l'acétylcholine : une protéine régulatrice engagée dans la communication cellulaire* (*C.R. Acad. Sci.*, 294, 121-123, 1982).

T. HEIDMANN, J. BERNHARDT, S. NEUMANN and J.P. CHANGEUX, *Rapid kinetics of agonist binding and permeability response analyzed in parallel on acetylcholine receptor-rich membranes from Torpedo marmorata* (*Biochemistry*, sous presse).

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

Jean-Pierre CHANGEUX :

— EMBO Workshop, « The Molecular Mechanisms of Brain Development », Strasbourg, 23-25 juin 1982.

— Réunion « Penser le cerveau », Laboratoire de Neuropsychologie humaine, Marseille, 28-30 juin 1982.

— Premier Congrès européen de Biologie Cellulaire, Paris, 23 juillet 1982.

— Course on « Principles and Methods in Receptor Binding », Urbino, 8-10 septembre 1982.

— Symposium « Basic Aspects of Receptor Biochemistry », Vienne, 10-12 septembre 1982.

— Conférence devant la Société Chimique de France, Paris, 16 septembre 1982.

— First Annual Otto Loewi Lecture, New York, 22 octobre 1982.

- N.R.P. Meeting, Rockefeller University, New York, 24-27 octobre 1982.
- Conférence sur « Neurobiology of Learning and Memory », Université de Californie, Irvine, 26-30 octobre 1982.
- Journées Nationales de l'enseignement de la Biologie, Lyon, 19-20 novembre 1982.
- Colloque U.N.E.S.C.O. : « Concepts de la Biologie Moderne et Développement futur », Paris, 29 novembre-1^{er} décembre 1982.
- Conférence à l'Ecole Polytechnique sur « le cerveau humain », Paris, 9 décembre 1982.
- Conférence à l'Université de Berlin sur « Special Problems of Biochemistry », Berlin, 19 janvier 1983.
- Conférence à l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, 7 février 1983.
- Workshop on « Immune Responses to Cell Membrane Receptors », Rancho Mirage, Californie, 23-26 février 1983.
- Conférence au « National Institute of Mental Health », Washington, 28 février 1983.
- Réunion de la Fondation pour l'étude du Système Nerveux Central, Genève, 24-28 mars 1983.
- Séminaire au Groupe de Physique des Solides, Ecole Normale Supérieure, Paris, 8 février 1983.
- Conférence à la Société de Biologie de Clermont-Ferrand, 19 avril 1983.
- Conférences à l'Université Hébraïque de Jérusalem, au Weizmann Institute of Sciences et à l'Université de Tel-Aviv, 5-11 mai 1983.
- Symposium International « New Perspectives in Membrane Dynamics », Strasbourg, 17-19 mai 1983.
- Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Molecular Neurobiology, 4-6 juin 1983.
- American Society of Biological Chemists, San Francisco, 6-10 juin 1983.
- Gordon Research Conference, « Development of the Central Nervous System », New Hampshire, 12-17 juin 1983.

Pierre BENOÎT :

- Conférence au Laboratoire de Neurobiologie, Faculté d'Orsay, 16 mai 1983.
- Colloque « Quo Vadis », Montpellier, 1-2 juin 1983.
- Colloque de Neuropathologie, Paris, 21 juin 1983.

Anne DEVILLERS-THIÉRY :

- Conférence à l'Institut Weizmann, Israël, 24 décembre 1982.
- Conférence au Collège de France, Paris, 19 janvier 1983.
- Conférence à l'Institut Pasteur sur « le clonage des gènes du récepteur », Paris, 27 juin 1983.

Jérôme GIRAUDAT :

- Séminaire à l'École Polytechnique sur « le clonage des gènes du récepteur », Paris, novembre 1982.
- Conférence à l'Hôpital de la Salpêtrière, Paris, 10 décembre 1982.
- Conférence à l'Association des Professeurs de Biologie, Seine-Maritime, 21 avril 1983.

Christopher HENDERSON :

- Séminaire au Département de Physiologie de l'Université d'Oxford, 7 juin 1982.
- Séminaire au Laboratoire de Neurobiologie de l'École Normale Supérieure, Paris, 22 juin 1982.
- Conférence au Premier Congrès Européen de Biologie Cellulaire, Paris, 21 juillet 1982.
- Séminaire au Centre de Neurochimie du C.N.R.S., Université Louis Pasteur, Strasbourg, 22 avril 1983.
- Séminaire à l'Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, 25 avril 1983.
- Conférence sur le rôle des Interactions cellulaires dans la Neurogénèse précoce, Colloque de Cargèse, 30 mai 1983.
- Séminaire Unité 153 de l'I.N.S.E.R.M., Paris, 17 juin 1983.

— Conférence au Colloque sur la Maladie de Parkinson dans le cadre de l'action concertée « Dynamique du Neurone », le 18 juin 1983.

— Organisateur et conférencier du Colloque sur les Dysfonctions de la Corne Antérieure, ministère de l'Industrie et de la Recherche, 21 juin 1983.

Jean MARIANI :

— Conférence au First European Congress on Cell Biology, Faculté d'Assas, Paris, 4-7 juillet 1982.

— 6th Meeting of the European Neurosciences Association, Torremolinos, septembre 1982.

— Conférence au Laboratoire de Neurobiologie, Faculté d'Orsay, Paris, 16 mai 1983.

— Séminaire à la Faculté de Médecine de Lausanne, 30 juin 1983.

DISTINCTIONS

Jean-Pierre CHANGEUX :

— First Annual Otto Loewi Lecture, New York, 22 octobre 1982.

— Prix Ricardo Wolf de Médecine, Jérusalem, 6 mai 1983.

— Prix littéraire Broquette-Gonin de l'Académie Française, mai 1983, pour *L'Homme Neuronal*.

— Associé Etranger de la National Academy of Sciences, Washington (U.S.A.), juin 1983.

Thierry HEIDMANN :

— Prix Laura Mounier de Saridakis de l'Académie des Sciences.

Jean MARIANI :

— Prix « à la mémoire des savants français assassinés par les allemands en 1940-1945 » de l'Académie des Sciences.