

Communications cellulaires

M. Jean-Pierre CHANGEUX, professeur

Le cours de cette année consacré, en principe, à l'anatomie et à la physiologie des récepteurs de neurotransmetteurs périphériques et centraux, a porté, en fait, sur le récepteur de l'acétylcholine. Les connaissances sur ce récepteur se sont développées, au cours des récentes années, avec une ampleur telle que celui-ci reste, de loin, le mieux connu de tous les récepteurs de neurotransmetteurs et en constitue un des meilleurs modèles de référence.

En guise d'introduction, un historique des concepts d'agent pharmacologique et de récepteur a été brièvement esquissé de l'Antiquité à nos jours.

L'évolution de ces deux concepts a été présentée plus sous l'angle d'une histoire des théories scientifiques que sous celui d'une histoire des scientifiques souvent excessivement mythifiés. A la mise en relief des discontinuités théoriques, transitions brutales d'un « paradigme » à un autre, associées au souci soit de renverser les théories régnautes (POPPER), soit d'en imposer de nouvelles (KUHN), a été préférée une conception plus « foisonnante » du développement de la connaissance (DEBRU). La rationalité des théories établies et bien organisées est souvent si prégnante à la réflexion qu'elle obscurcit les différences en apparence moins importantes, bien que porteuses d'un sens nouveau, qui se sont présentées successivement et/ou concurremment au fil de l'histoire. La philosophie de l'histoire des sciences devient, dès lors, une « épistémologie de la complexité », « une perception plus fine de clivages nouveaux et de parentés inédites, ... d'un mouvement qui brise d'anciens objets, en construit d'autres par convergence de l'hétérogène », de sorte que « la rationalisation s'opère par intégration de séries polyphylétiques qui convergent en un *point singulier* où se trouvent construits, simultanément, un nouvel objet et la rationalité qui l'investit » (DEBRU).

Aux origines, la pratique médicale est intimement liée à une relation avec le surnaturel qu'établit un personnage particulier du groupe social : le *chaman*. Celui-ci, par la technique de l'extase, se met dans un état de « transe pendant lequel son âme et pensée quittent son corps et montent au ciel ou des-

« cendent sous terre » (ELIADE) et, par là, acquiert une connaissance qui lui sert à soigner la maladie (BEAN et VANE). Son pouvoir de guérir se trouve directement associé à l'extase. Cette « pensée magique » constitue en fait une première tentative d'explication du monde naturel. Le chaman conquiert la maladie comme objet, il en élabore une première représentation. Ce faisant il s'aide de plantes à la fois pour accéder lui-même à l'extase (hallucinogènes) et pour chasser les mauvais esprits du corps du patient. Il établit ainsi un premier répertoire de plantes actives.

Ces pratiques chamaniques, qui persistent de nos jours dans quelques petits groupes sociaux de chasseurs-collecteurs, se présentent dans la plupart des sociétés humaines et paraissent correspondre à un stade défini de leur évolution. On en a retrouvé les traces dans une tombe de Shavidor (Irak) datant de 60 000 ans avant notre ère où les pollens de 8 plantes médicinales ont été identifiés à proximité du squelette.

En Mésopotamie, 3 000 - 1 000 avant notre ère, de nombreux documents écrits en cunéiforme attestent du développement d'une médecine archaïque encore proche des pratiques chamaniques. La maladie est une punition divine (consécutive à une faute) et la guérison résulte d'une purification-rémission (du péché) ou *catharsis*. Alors apparaît le terme de *pharmacon* (en grec) pour désigner l'action magique exercée par le moyen des plantes pour guérir (mais aussi empoisonner) encore attribuée au « démon » qui habite le remède (ou le poison). En même temps, l'inventaire systématique des plantes médicinales et substances minérales ou animales actives se développe. Sur les tablettes de la bibliothèque d'Assurbanipal, on lit 250 noms de plantes médicinales, parmi eux, mandragore, ricin, éllébore, jusquiame ainsi que pavot et cannabis. Les vertus de l'opium et du haschich étaient déjà connues des Mésopotamiens.

Ce répertoire va s'accroître encore avec les Egyptiens et les Grecs, mais c'est avec ces derniers, seulement, qu'une authentique médecine rationnelle va apparaître et se développer. Le milieu culturel s'y prête. La coexistence et le respect d'écoles de pensées différentes, le développement des discussions publiques qui effacent progressivement secret et mystère, l'apparition de médecins professionnels distincts des prêtres, la distinction entre diagnostic et traitement ainsi que l'examen critique des effets du traitement, font que progressivement la médecine se libère de l'irrationnel. Le *pharmacon* perd son contenu magique. De remède purificateur, il devient médicament, *agent pharmacologique*.

Avec DIOSCORIDE (I^{er} siècle à Rome), GALIEN (II^e siècle) puis les médecins arabes, AL RAZI Rhazès, 923), IBN SINA (Avicennes, 980-1037), la pharmacopée continue de s'enrichir, en particulier des connaissances de la médecine orientale. Momentanément, l'alchimie et la scholastique monastique font

revivre les idées et pratiques de la médecine archaïque. Mais, avec la Renaissance, le retour aux originaux grecs et à la discussion critique, impose, de manière définitive, la rationalité en thérapeutique médicale.

Paracelse introduit la notion de *principe actif* ou « quintessence » et aussi celle, essentielle, de *dose* active. Von HALLER recommande d'essayer tout médicament chez un sujet sain avant de l'introduire dans la pharmacopée ! Enfin, avec LAVOISIER, se multiplie l'identification des espèces chimiques. L'agent pharmacologique est désormais une *substance chimique définie à action toxique ou médicamenteuse, qui modifie de manière précise l'état de l'organisme, sain ou malade*. Cette notion aura mis des millénaires pour se dégager de la pensée magique par élagages successifs de significations superflues, par élimination du contenu symbolique et ajustement au réel, par « stabilisation sélective », enfin, du *sens* qu'il a aujourd'hui.

Avec Claude BERNARD et ses précurseurs (FONTANA, BRODIE), l'analyse de l'action des agents pharmacologiques prend un tour expérimental. Dans une remarquable série d'expériences (1844 - 1856) sur les effets du curare, Claude BERNARD démontre successivement que le curare : 1) paralyse les muscles squelettiques sans interférer avec les battements du cœur ; 2) ne bloque ni le nerf moteur, ni le muscle mais l'action du nerf sur le muscle ; 3) n'a pas d'effet sur le système sensoriel, « il détruit le mouvement mais n'a pas d'action sur le sentiment » ; 4) affecte les parties périphériques du système nerveux mais pas les parties centrales. Mais Claude BERNARD fait fausse route lorsqu'il croit que le curare agit par les terminaisons motrices en remontant jusqu'à la moelle épinière. Néanmoins, cette restriction du champ d'action de la drogue, cette « localisation » de l'effet toxique à un organe défini, et l'emploi du poison comme « bistouri chimique » ne constituent un progrès important dans la compréhension du mode d'action des agents pharmacologiques.

Au-delà de l'organe proprement dit, Claude BERNARD se perd en conjectures ; il parle de « lésion vitale », d'action « immatérielle » sans saisir le lien qui existe entre le caractère chimique d'une substance et son effet physiologique. Les progrès convergents de la chimie organique et de la naissante « biochimie » donneront accès au niveau de compréhension suivant qui manquait à Claude BERNARD. En 1869, CRUM-BROWN et FRASER synthétisent des sels d'ammonium quaternaire qui comme le curare paralysent. Ils déclarent alors « qu'une relation existe entre l'action physiologique d'une substance et sa composition et constitution chimique ». PASTEUR, à la suite de ses expériences sur les tartrates souligne l'importance de la « *disymétrie moléculaire* propre aux matières organiques intervenant dans un phénomène de l'ordre physiologique » (1860). Puis Emil FISCHER synthétise seize isomères du glucose et montre que seuls quatre d'entr'eux sont fermentescibles et présentent une parenté stéréochimique non ambiguë. « L'enzyme et le glucoside, écrit-il,

doivent s'adapter l'un à l'autre comme une *clé* à une *serrure* pour pouvoir effectuer une action chimique l'une sur l'autre » (1898). Paul EHRlich, après ses premiers travaux sur les colorants, qui selon lui, se fixent sur les « chaînes latérales » d'une « molécule protoplasmique géante » s'intéresse au mécanisme de la réaction toxine-anticorps. « On devra admettre, écrit-il, que cette capacité de lier les anticorps doit être ramenée à l'existence d'un groupement atomique spécifique appartenant au complexe toxique ». Enfin, John Newport LANGLEY (1905-1906) reprenant les expériences de Claude BERNARD étudie les effets comparés de la nicotine et du curare sur le muscle du poulet, montre l'effet « agoniste » du premier, « antagoniste » de l'autre. Il décrit la localisation ponctuelle immédiate sous le nerf de l'aire de sensibilité à la nicotine, et démontre que celle-ci persiste après dénervation. Il conclut : « la substance du muscle qui se combine avec la nicotine ou le curare n'est pas identique avec la substance qui se contracte. Il convient d'avoir un terme pour ce constituant spécialement excitable et je l'ai appelé *substance réceptive* », ou *récepteur*. D'un tissu à l'autre, les différences observées seront dues « aux différents caractères des substances réceptives ». Le concept de récepteur-substance chimique évacue définitivement toute référence au vitalisme encore présente chez Claude BERNARD. La démarche analytique conduisant à une « *localisation* » de plus en plus fine de la cible des agents pharmacologiques, associée à une recherche de leurs bases *matérielles* issue des données des sciences physiques et chimiques auront joué un rôle déterminant dans la définition du concept de récepteur pharmacologique.

Les concepts d'agent pharmacologique et de récepteur prennent tout leur sens lorsqu'on les intègre à un troisième concept, distinct des précédents, celui de neurotransmission chimique. S'intéressant à la « transmission de l'excitation » du nerf moteur au muscle, DU BOIS REYMOND suggère, dès 1877, deux mécanismes : « soit il existe à la frontière de la substance contractile une *secrétion stimulatrice*..., ou, le phénomène est de nature *électrique* ». Puis ELLIOTT (1905), après avoir montré que « l'urèthre de chat se contracte de la même manière par l'excitation des nerfs hypogastriques et par l'injection d'adrénaline », conclut que « l'adrénaline (en fait la nor-adrénaline) peut être le *stimulant chimique* libéré à chaque occasion quand l'impulsion arrive à la périphérie ». Le récepteur de ce stimulant chimique (appelé depuis *neurotransmetteur*) prend naturellement sa place à la surface du muscle, en regard de la terminaison nerveuse.

Plusieurs décennies furent nécessaires pour que ce schéma soit définitivement accepté (sauf LORENTE DE NÓ, NACHMANSOHN) concurremment à un mode de transmission purement électrique. Les faits majeurs invoqués en faveur du rôle de l'acétylcholine comme neurotransmetteur au niveau de la jonction nerf-muscle sont les suivants : 1) de toutes les substances naturelles (ou de synthèse) l'acétylcholine est la plus active sur la contraction du muscle (DALE,

1914), 2) la stimulation du nerf vague provoque le ralentissement du cœur par la sécrétion d'un « vagus stoff » (1921) dont la dégradation par l'acétylcholinestérase est bloquée par l'ésérine (LOEWI et NAVRATIL, 1926) ; 3) l'acétylcholine est libérée par la terminaison nerveuse (DALE *et coll.*, 1936) et la stimulation répétée du nerf entraîne l'épuisement de la terminaison en acétylcholine [lorsque sa synthèse est bloquée par l'hémicholinium (BIRKS et MAC INTOSH, 1961)].

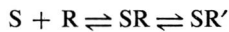
*
**

Les premiers travaux qui ont suivi la formulation du concept de récepteur ont porté, avant tout, sur l'analyse quantitative de la réponse à un agent pharmacologique particulier. Le dispositif expérimental le plus souvent employé est « l'organe isolé » (muscle, intestin, ...) dont on enregistre les contractions sur un tambour enduit de noir de fumée. On mesure la *cinétique* du développement de la réponse et son *amplitude* maximum à des dilutions variées de substance active. Les modèles mathématiques employés s'inspirent directement des travaux des physicochimistes et enzymologistes sur la catalyse enzymatique (Victor HENRY, 1903 ; MICHAELIS et MENTEN, 1913) : ils postulent l'existence d'un complexe [récepteur - agent pharmacologique] homologue du complexe [enzyme - substrat]. Toutefois, à la différence du substrat, l'agent pharmacologique lié au récepteur n'est pas transformé. Sa liaison réversible sur le site actif du récepteur suffit pour déclencher la réponse. L'effet des agonistes est bloqué par des analogues de structure de ceux-ci sans que change l'amplitude de la réponse avec une diminution apparente d'affinité. Ceux-ci sont qualifiés d'*antagonistes compétitifs* et, dans le cadre des modèles mathématiques employés (MICHAELIS et MENTEN, 1913) supposés se lier sur le même site que les agonistes et d'une manière mutuellement exclusive sans toutefois déclencher une réponse (CLARKE, 1926 ; GADDUM, 1926). D'autres agents bloquants diminuent en premier chef l'amplitude de la réponse sans modifier l'affinité apparente, ils sont qualifiés de *non-compétitifs* et supposés se lier à des sites distincts du site actif.

L'ajustement des données expérimentales par les équations théoriques issues de ces divers modèles se heurte toutefois à deux difficultés : 1) la réponse mesurée n'est que très indirectement liée à la réaction initiale agoniste-récepteur et, en général, ne lui est pas directement proportionnelle ; 2) les cinétiques mesurées dans ces conditions sont limitées par la diffusion et ne concernent que très indirectement la liaison de l'effecteur au récepteur.

L'emploi des méthodes d'enregistrements électrophysiologiques qui se développe à partir des années 30 permettra de surmonter cette double difficulté. En 1938, GÖPFERT et SCHAEFER enregistrent à l'aide d'électrodes extracellulaires la première réponse « indirecte » de la fibre musculaire à la stimulation de la fibre nerveuse motrice ou potentiel post-synaptique (ou encore « de plaque »).

Il s'agit d'une dépolarisation d'environ $-mV$ (négatif à l'intérieur) qui se déclenche brusquement (avec un délai d'environ 0,3 msec ou délai synaptique) et décline avec un $t_{1/2}$ d'environ 1 — 3 msec. Elle peut être « simulée » par application locale d'acétylcholine injectée par iontophorèse au niveau de la plaque motrice (NASTUK, 1953). Par cette méthode DEL CASTILLO et KATZ (1954-1957) analysent en détail l'action de divers agonistes et antagonistes cholinergiques et proposent un modèle cinétique directement inspiré des travaux sur l'acétylcholinestérase (à laquelle ils se réfèrent explicitement) :



où R est le « récepteur (dans son sens restreint) », S l'acétylcholine-substrat, et « SR' » le composé dépolarisant dont la nature et la transformation sont à présent, inconnus ».

En plus d'une amélioration considérable de la résolution dans le temps, les méthodes électrophysiologiques apportent une information essentielle sur la nature du « court-circuit » (FATT et KATZ, 1950) provoqué par l'acétylcholine. Celle-ci entraîne, dans le cas de la plaque motrice des vertébrés, un accroissement sélectif de la conductance aux cations : Na^+ , K^+ , Ca^{++} (des changements de conductance à l'anion Cl^- ont lieu dans le cas du récepteur « inhibiteur » de l'acide gamma aminobutyrique) (TAKEUCHI et TAKEUCHI, 1960).

Prenant la mesure de la conductance membranaire maximale (déterminée dans les conditions de voltage imposé et d'échelle de temps de la milliseconde) comme index du nombre de canaux ioniques ouverts par l'agoniste, on peut désormais construire des courbes dose-réponse (DIONNE *et coll.*, 1978 ; DREYER *et coll.*, 1978 ; TRAUTMANN, 1983) beaucoup plus proches du mécanisme élémentaire de la réponse que celles obtenues par les méthodes standard de la pharmacologie. Les constantes de dissociation *apparentes* obtenues sont 20 - 50 μM pour l'acétylcholine (400 μM pour la carbamylcholine), domaine de concentration qui est proche de celui de l'acétylcholine dans l'espace synaptique lors du passage du signal nerveux (0,3 - 1,0 mM) (KUFFLER et YOSHIKAMI, 1975 ; KATZ et MILEDI, 1977).

Toutefois, une des limitations insurmontables des enregistrements électrophysiologiques est que ceux-ci portent exclusivement sur une réponse ionique seule susceptibles d'entraîner une modification des paramètres électriques de la membrane. L'inférence des données de liaison du neurotransmetteur à partir de la réponse qu'il produit ne peut être suggéré qu'à titre d'hypothèse. Il est clair que l'élucidation du *mécanisme* d'ouverture du canal par l'acétylcholine requiert, obligatoirement, la mesure directe de sa liaison qui constitue également la porte d'entrée des méthodes biochimiques et physicochimiques sur un système qui peut désormais devenir entièrement *a*-cellulaire.

L'obtention des premières données de liaison directement associées au récepteur de l'acétylcholine a été rendue possible, en 1970, par l'emploi d'un tissu particulièrement favorable, l'organe électrique de poisson Gymnote ou Torpille. Cet organe spécialisé dans la production de décharges électriques (0,5 A, 250 V Gymnote ; 50 A, 20-60 V Torpille) se compose de cellules multinucléées : électroplaques ou électrocytes, qui, chacune, reçoit plusieurs centaines (milliers) de synapses toutes identiques entr'elles, totalisant 10^{11} à 10^{12} synapses par organe (Gymnote). Le tissu électrique est donc, à la fois, extrêmement riche en synapses cholinergiques et très homogène, ce qui le rend particulièrement propice aux études biochimiques (NACHMANSOHN, 1959). Autre avantage, l'électroplaque est une cellule géante qui se dissèque et avec laquelle on enregistre sans difficulté la réponse électrique aux agents pharmacologiques actifs sur le récepteur. L'électroplaque isolée crée donc le chaînon manquant entre physiologie et biochimie. Enfin, l'organe électrique se prête au fractionnement subcellulaire. Des centrifugations successives permettent de purifier à partir d'homogénats d'organe électrique des fragments de membrane qui se referment sur eux-mêmes en vésicules closes ou « microsacs ». Équilibrés avec des ions perméants marqués, ces microsacs répondent à la présence d'acétylcholine par une augmentation de flux ionique passif. La pharmacologie de cette réponse *in vitro* est en tous points identique à celle de l'électroplaque (KASAI et CHANGEUX, 1971).

Des fragments de membrane de ce type peuvent donc servir d'abord à l'identification du site récepteur par des méthodes de liaison et ensuite à l'isolement de la molécule qui le porte. Les premières tentatives de marquage du site récepteur se heurtèrent à la multiplicité des sites de liaison de ligands radioactifs employés (flaxédil (Chagas), curare (Ehrenpreis)) et à l'absence de spécificité (de Robertis). Une étape décisive dans l'identification de ce site a résulté de l'emploi d'une toute autre catégorie de marqueurs : les petites protéines toxiques (6 à 7 000 daltons) présentes dans les venins de plusieurs espèces de serpent (*Naja*, *Bungarus*) (LEE et CHANG, 1966). Ces toxines se fixent avec une très haute affinité (K_D 10^{-9} à 10^{-11} M) et une extrême sélectivité sur le site récepteur. Elles serviront à l'identifier soit par déplacement d'agoniste cholinergique radioactif (CHANGEUX *et coll.*, 1970), soit par liaison directe après marquage radioactif (MILEDI *et coll.*, 1971).

La molécule portant ce site, solidement liée à la membrane cellulaire, passe en solution aqueuse sans perdre ses propriétés de liaison en présence de détergents non dénaturants (cholate, désoxycholate, Triton X 100). Elle peut désormais être purifiée jusqu'à l'homogénéité par chromatographie d'affinité sur des billes de toxine α ou de ligands cholinergiques immobilisés. Quatre catégories de faits démontrent sans ambiguïté que la protéine purifiée est bien le récepteur physiologique : 1) elle lie les agonistes et antagonistes cholinergiques dans le même ordre d'affinité que l'électroplaque isolée ; 2) l'immu-

nisation d'un animal de laboratoire par le récepteur de poisson déclenche une paralysie auto-immune analogue à la myasthénie grave chez l'homme et les anticorps ainsi obtenus bloquent la réponse physiologique ; 3) les anticorps anti-récepteurs et les toxines α marquent sélectivement la protéine réceptrice au niveau de la membrane post-synaptique ; 4) la protéine purifiée une fois réinsérée dans des doubles couches lipidiques artificielles règle les flux d'ions perméants avec les mêmes caractéristiques qu'intégrée naturellement à la membrane post-synaptique. La protéine purifiée contient donc le canal ionique, le site récepteur de l'acétylcholine, ainsi que le mécanisme de couplage « allostérique » entre ces deux catégories de sites.

La protéine réceptrice purifiée existe sous deux formes moléculaires : *légère*, de masse moléculaire 290 000 daltons et *lourde*, de masse moléculaire double (580 000 daltons). La forme légère est un pentamère hétérologue $\alpha_2 \beta \gamma \delta$ composé de quatre chaînes de masse moléculaire *apparente* 40 000 (α), 50 000 (β), 60 000 (γ) et 66 000 (δ) daltons (REYNOLDS et KARLIN, 1978 ; RAFTERY *et coll.*, 1980). Elle contient deux exemplaires du site de liaison de l'acétylcholine et des toxines α . Les chaînes α sont marquées par des ligands d'affinité covalents du site récepteur et portent donc tout ou partie de ce site. Les bloquants non compétitifs de la réponse ionique, supposés se fixer au niveau du canal ionique lui-même, se lient à un site commun aux quatre chaînes du récepteur et présent en un seul exemplaire par forme légère. La chaîne δ intervient dans l'association de deux formes légères en dimère lourd par l'intermédiaire d'un pont disulfure inter moléculaire.

Les quatre chaînes du récepteur traversent la membrane et sont associées en « faisceau » compact, grossièrement cylindrique, de dimension 110 Å sur 90 Å. Vue de face au microscope électronique (CARTAUD, STROUD) la forme légère se présente comme une rosette centrée de diamètre 90 Å au niveau de laquelle apparaissent, après analyse d'image, 5 masses inégales correspondant vraisemblablement aux 5 chaînes. Deux d'entr'elles, les plus petites, situées à 2 h et à 6 h (donc non adjacentes) sont renforcées par la toxine α et peuvent donc être identifiées aux chaînes α . La forme lourde se présente, dans les mêmes conditions, comme un « doublet » de formes légères reliées entr'elles de manière flexible par les chaînes δ (BON, VAN RAPENBUSCH *et coll.*, 1984).

*
**

La mise au point d'un test de liaison spécifique du site récepteur puis la purification de la protéine réceptrice ont constitué deux étapes décisives dans le développement des recherches sur le récepteur de l'acétylcholine. La mise en application des méthodes de la génétique moléculaire à l'étude du récepteur en a été une troisième, tout aussi fondamentale.

Au préalable, deux ensembles de résultats devaient être obtenus :

1) Données de structure primaire. Des méthodes de purification à grande échelle ont permis d'obtenir des quantités suffisantes de sous-unité α pour que la séquence des acides aminés NH_2 -terminaux puisse être établie par la méthode de dégradation d'Edman automatisée (DEVILLERS-THIÉRY *et coll.*, 1980). De remarquables homologies de séquence (35 à 50 % d'identité) existent entre les quatre chaînes du récepteur (RAFTERY *et coll.*, 1981).

2) Expression de l'ARN messenger du récepteur. *In vitro*, l'ARN messenger d'organe électrique est traduit en protéines dans un lysat de réticulocyte en présence d'acide aminé radioactif et les chaînes du récepteur sont identifiées par immunoprécipitation avec des anticorps (monospécifiques ou non) dirigés contre chacune des chaînes (MENDEZ *et coll.*, 1980). *In vivo*, l'ARN messenger injecté dans l'oocyte de Xénope produit un récepteur qui lie l' α -bungarotoxine, s'incorpore à la membrane de l'oocyte et produit des canaux ioniques ouverts par l'acétylcholine (SUMIKAWA *et coll.*, 1981, MILEDI et SUMIKAWA, 1982). A la différence du récepteur exprimé *in vitro*, le récepteur obtenu *in ovo* a subi une maturation post-transcriptionnelle complète (glycosylation en particulier).

Ces données acquises, les ADN complémentaires (ADNc) de l'ARN messenger cytoplasmique pouvaient désormais être clonés. Après réalisation d'une « banque » d'ADNc à partir de l'ARN messenger total de l'organe électrique, des clones codant pour chacune des chaînes du récepteur ont été isolés avec succès par deux méthodes :

1) Sélection de clones spécifiques de l'organe électrique (par hybridation *in situ* avec des ADNc radioactifs totaux de foie, rate et organe électrique) suivie, pour les clones retenus, par la purification de l'ARN messenger complémentaire (par hybridation de l'ARN messenger total de l'organe électrique sur l'ADN du clone) et son expression *in vitro*, le produit obtenu étant identifié par immunoprécipitation (GIRAUDAT *et coll.*, 1982 ; BALLIVET *et coll.*, 1982).

2) La sélection directe de clones codant pour les chaînes du récepteur par hybridation avec des sondes oligodésoxyribonucléotidiques synthétisées sur la base des données de séquence obtenues à partir de la protéine (NODA *et coll.*, 1982, 1983 ; SUMIKAWA *et coll.*, 1982).

Les insertions ADNc des clones obtenus ont été ensuite séquencés par la méthode de MAXAM et GILBERT et la séquence protéique de chacune des sous-unités déduite (NODA *et coll.*, 1982, 1983 ; DEVILLERS-THIÉRY *et coll.*, 1983). Ces séquences contiennent, on s'y attend, les fragments NH_2 -terminaux déterminés chimiquement mais ne débutent pas par eux. Ils sont précédés par 17-24 acides aminés, essentiellement hydrophobes, qui sont clivés lors de la maturation de la protéine et constituent une séquence « signal » (BLOBEL et DOBBERSTEIN) servant à l'insertion de la chaîne polypeptidique naissante dans la membrane. Les masses moléculaires exactes des quatre chaînes sont $\alpha = 50.116$, $\beta = 53.681$, $\gamma = 56.279$, $\delta = 57.565$. Celles-ci présentent

sur toute leur longueur des homologies de séquence importantes en accord 1) avec l'hypothèse d'une évolution à partir d'un gène ancestral commun (RAFTERY *et coll.*, 1981), 2) la présence d'une « pseudo »-symétrie rotationnelle d'ordre 5 de la molécule de récepteur (CHANGEUX, 1981).

L'analyse (quantitative ou non) de la distribution des acides aminés hydrophiles/hydrophobes le long de la séquence des 4 chaînes conduit à subdiviser celles-ci en plusieurs domaines (2 hydrophiles, l'un grand, l'autre petit, et 4 hydrophobes) ainsi qu'à proposer des modèles de l'organisation transmembranaire de ces chaînes. Sur la base des résultats de protéolyse *in situ* (WENNOGLE et CHANGEUX, 1980) le grand domaine hydrophile NH₂-terminal est disposé sur la face externe, synaptique, le petit sur la face interne, cytoplasmique, de la membrane. Les quatre domaines hydrophobes, d'environ 20 acides aminés chacun, sont supposés constituer des α -hélices transmembranaires. Si elles représentent les seules traversées de la membrane, la partie COOH-terminale se trouve, dans ces conditions, orientée vers la face synaptique (CLAUDIO *et coll.*, 1983 ; DEVILLERS-THIÉRY *et coll.*, 1983 ; NODA *et coll.*, 1983). Si au contraire, une cinquième traversée a lieu au niveau d'une hélice « amphipathique » A (FAIRCLOUGH et STROUD ; GUY, 1984), le COOH-terminal se trouve maintenant orienté vers le cytoplasme. Le canal ionique est, dans tous les cas, supposé résulter de l'assemblage des 5 chaînes du récepteur, au niveau de leur partie commune, dans l'axe de « pseudo »-symétrie de la molécule. Suivant le modèle considéré, l'hélice transmembranaire I (NODA *et coll.*, 1983), III (DEVILLERS-THIÉRY *et coll.*, 1983) ou A (STROUD ; GUY, 1984) fait partie des parois du canal ; dans les deux premiers cas, celui-ci se trouve « non chargé », dans le second, il est environné de charges (en particulier négatives donc sélectives pour les cations) aux orifices du canal.

Le gène chromosomique codant pour la chaîne α a été cloné chez l'homme (NODA *et coll.*, 1983) ; il est morcelé en 9 exons codants (P1 à P9) séparés par 8 introns. Il est remarquable que ce découpage se superpose largement aux principaux domaines d'organisation transmembranaire des chaînes : l'exon P1 code pour la plus grande part du peptide signal, l'exon P2 pour le reste de celui-ci et, conjointement à P3-P5, pour le grand domaine hydrophile extracellulaire, P6 contient l'hélice transmembranaire I, P4 les hélices II et III, P8 le domaine cytoplasmique hydrophile, P9 l'hélice IV. L'homologie de séquence avec la chaîne α de la Torpille est très importante (80 %) et particulièrement élevée pour les domaines transmembranaires. Ce qui est vrai pour le récepteur de Torpille l'est donc aussi pour le récepteur humain !

L'analyse par hybridation de transfert du nombre de gènes chromosomiques codant pour la chaîne α montre qu'il n'existe, en toute vraisemblance, qu'un seul gène codant pour la chaîne α par génome haploïde de Torpille (KLARSFELD *et coll.*, 1984) et de Souris (MERLIE *et coll.*, 1983). La stoechiométrie (2 α , 1 β , 1 γ , 1 δ) de la molécule mature ainsi que les différences notées entre

récepteur embryonnaire et adulte résultent donc de processus post-transcriptionnels de nature « épigénétique ».

Enfin, l'expression du récepteur fonctionnel à partir des ADNc clonés codant pour chacune des chaînes du récepteur a été obtenue (MISHINA *et coll.*, 1984). Les ADNc ont d'abord été insérés dans des vecteurs d'expression dérivés du virus animal SV40 puis ceux-ci ont été introduits par transfection dans des cellules de singe (réceptrices) COS. Celles-ci ont alors synthétisé les ARN messagers de chacune des chaînes et ceux-ci ont ensuite été injectés dans les oocytes de Xénope. Lorsque les ARN messagers des 4 chaînes sont introduits dans l'oocyte, on obtient un récepteur qui lie l' α -bungarotoxine et produit des canaux ioniques sensibles à l'acétylcholine de manière semblable au récepteur natif. La délétion d'un ARN messenger codant pour l'une des 4 chaînes entraîne une perte radicale des propriétés régulatrices du récepteur (une très faible réponse électrophysiologique est notée avec $\alpha\beta\gamma$ et $\alpha\beta\delta$). Enfin, en accord avec l'expérience de liaison, l'absence de messenger codant pour la chaîne α abolit totalement la liaison d' α -bungarotoxine.

*
**

Parallèlement à l'acquisition de ces données structurales, qui se situent, désormais, au niveau atomique, se développaient, souvent de manière indépendante, les connaissances sur les propriétés fonctionnelles du récepteur. Pendant des décennies, ces connaissances se sont fondées exclusivement sur la mesure de paramètres électriques dont nous avons déjà souligné les limites.

Un important progrès a cependant été réalisé, dans ce domaine, par un accroissement spectaculaire de résolution dans l'analyse de l'effet de l'acétylcholine. « Il paraît possible, cependant — écrivaient KATZ et MILEDI (1970) — que pendant l'application continue de l'acétylcholine à la plaque motrice, les effets statistiques de bombardement moléculaire puissent être discernables par un accroissement de *bruit* membranaire superposé à une dépolarisation moyenne maintenue... ». Ce « bruit » directement associé à l'effet des agonistes est effectivement enregistré et analysé en termes soit d'effets de décharge (shot effects) (KATZ et MILEDI, 1972) soit d'ouverture-fermeture de tout-ou rien, de canaux discrets (ANDERSON et STEVENS, 1973). L'enregistrement de fluctuations de canaux uniques ayant la forme prédite par le second modèle est ensuite réalisé par NEHER et SAKMANN (1976). D'un agoniste à l'autre, l'amplitude de la fluctuation élémentaire, de conductance γ , ne varie pas (~ 20 pmho), tandis que le temps moyen d'ouverture τ change (carbamylocholine 11 msec, acétylcholine 26 msec, suberyldicholine 45 msec). L'amélioration des techniques d'enregistrement (HAMILL *et coll.*, 1981) confirme ce résultat mais fait également apparaître des complications de détail dont l'interprétation devient de plus en plus difficile et incertaine (hétérogénéité

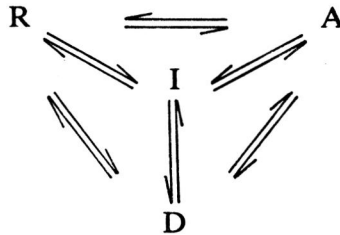
de la distribution des temps d'ouverture, interruption brutale de l'ouverture du canal (nächschlag, canaux ouverts au 1/3 de la conductance normale, etc.).

L'ouverture des canaux ioniques, ou *activation*, a lieu dans les conditions physiologiques, lors de la libération d'une « impulsion chimique » d'acétylcholine hautement concentrée (10^{-4} - 10^{-3} M) et pendant un temps très bref (< msec). Lorsque le neurotransmetteur est appliqué sur la membrane post-synaptique pendant plusieurs secondes ou minutes et à des concentrations qui peuvent être plus faibles, l'amplitude de la réponse de perméabilité diminue de manière réversible en fonction du temps, il y a *désensibilisation* (KATZ et THESLEFF, 1957). Celle-ci s'effectue en au moins deux étapes (FELTZ et TRAUTMANN, 1980) : rapide ($\tau \sim 7$ sec) et lente ($\tau \sim 150$ sec) qui se manifestent, respectivement, sur des enregistrements de canaux uniques, par la présence de « rafales » de canaux ouverts et de « groupes » de rafales de tels canaux (SAKMANN *et coll.*, 1980).

Les transitions d'activation et de désensibilisation ont été retrouvés *in vitro* par la méthode de mesure des flux ioniques sur des préparations de membranes purifiées (KASAI et CHANGEUX, 1971 ; POPOT *et coll.*, 1976) et même à partir de récepteur purifié reconstitué sous forme fonctionnelle au sein de bicouches lipidiques (POPOT *et coll.*, 1981 ; ANHOLT *et coll.*, 1981). Une amélioration importante de la résolution dans le temps (qui atteint quelques millisecondes) a résulté de l'introduction des méthodes de mélange et blocage rapide des flux (quench flow) (HESS ; J.B. COHEN ; MOORE et RAFTERY, 1980 ; HEIDMANN *et coll.*, 1983). La courbe de variation des flux initiaux avec la concentration d'acétylcholine est légèrement sigmoïde ($n_H \sim 1.7 - 2.0$) avec un K_D apparent de 40-80 μM et se superpose pratiquement à la courbe dose-réponse obtenue par des mesures électrophysiologiques dans des conditions de voltage imposé. De même, les deux phases, rapide et lente, de la désensibilisation se retrouvent *in vitro*.

Les fragments de membrane purifiés et le récepteur reconstitué possèdent donc toutes les propriétés fonctionnelles du complexe récepteur-canal ionique reconnues, *in vivo*, par la mesure de paramètres électriques. Ces systèmes présentent toutefois l'avantage unique de permettre, dans les mêmes conditions, la mesure de la liaison d'agoniste et la mise en relation de cette liaison avec l'ouverture du canal ionique. Les premières études de liaison à l'équilibre de l'acétylcholine et d'autres ligands cholinergiques révèlent une affinité très élevée ($K_D \sim 10^{-8}$ M) de l'acétylcholine pour le site récepteur dans les domaines de concentration trois ordres de grandeur plus bas que la concentration d'acétylcholine dans la fente synaptique lors de la transmission de l'influx nerveux. Une affinité aussi élevée était, d'autre part, incompatible avec la stimulation répétitive de la plaque motrice, le temps de résidence moyen de l'acétylcholine sur son site pouvant atteindre 100 msec. En réalité,

l'analyse cinétique de la liaison de l'acétylcholine (cf. WEBER *et coll.*, 1975) ou d'analogues fluorescents (cf. HEIDMANN et CHANGEUX, 1979) montrait que, au repos, en l'absence d'agoniste, le récepteur lie l'acétylcholine avec une faible affinité ($K_D \sim 50 \mu\text{m}$) et que le mélange rapide avec celle-ci déclenche une cascade de transitions qui s'achève, lentement, sur l'état de haute affinité du récepteur. Le modèle à 4 états suivant rend compte des cinétiques de liaison :



où R est l'état de repos, où l'affinité pour l'acétylcholine s'accroît de $R \rightarrow A \rightarrow I \rightarrow D$, et où $R \rightarrow A$ est très rapide (non résolu), les transitions vers I et D se situant, respectivement, dans des domaines de temps de la fraction de seconde à plusieurs secondes ou minutes.

La comparaison de ces données de liaison aux données de flux dans les mêmes domaines de temps (HEIDMANN *et coll.*, 1983) s'accordent pour suggérer que, dans l'état A, le canal est ouvert (état *actif*), et qu'il est fermé dans les états d'affinité élevée I et D (états *désensibilisés*). En accord avec le modèle de KATZ et THESLEFF (1957) la désensibilisation de la réponse s'identifie à la (aux) transition(s) lente(s) vers l'état inactif de haute affinité.

Ce schéma est d'autre part en accord avec le modèle de transition « concertée » proposé pour les protéines allostériques (MONOD *et coll.*, 1965). En particulier, l'état D préexiste spontanément à la liaison d'agonistes (20% au repos) et peut être stabilisé à l'équilibre, par des ligands « allostériques » autres que l'agoniste (les bloquants non compétitifs par exemple) (HEIDMANN *et coll.*, 1983). Enfin, l'analyse cinétique de l'attachement covalent d'un bloquant non compétitif, la chlorpromazine, au niveau de son site unique de liaison (commun aux 5 sous-unités) démontre que l'accès de ce site à la chlorpromazine s'accroît de manière spectaculaire dans les conditions de peuplement de l'état A. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse suivant laquelle ce site unique fait partie du canal ionique. L'effet des bloquants non-compétitifs sur la réponse ionique s'expliquerait donc, à la fois, par un blocage stérique du canal et par un déplacement allostérique de l'équilibre conformationnel en faveur de l'état D.

J.-P. C.

SÉMINAIRES

Déterminisme de la forme du neurone

26 mars, Dennis BRAY : Growth cone guidance.

16 avril, Bernard DROZ : Dynamique de l'organisation neuronale.

30 avril, Daniel LOUVARD : De la cellule intestinale au neurone.

7 mai, Alain GHYSEN : Segmentation du corps et organisation neuronale chez la drosophile.

14 mai, Alain PROCHIANTZ : Expériences récentes sur la morphogenèse neuronale *in vitro*.

21 mai, Gérard PERCHERON : L'utilisation de l'espace par les neurones.

28 mai, Constantino SOTELO : Acquisition de la forme de la cellule de Purkinje : 1. Rôle des facteurs génétiques.

4 juin, Constantino SOTELO : Acquisition de la forme de la cellule de Purkinje : 2. Rôle des interactions cellulaires.

18 juin, Jean MARIANI : Le développement de l'arborisation terminale de l'axone et sa régulation.

COMPTE RENDU DU LABORATOIRE DE COMMUNICATIONS CELLULAIRES

Année 1983

La recherche a été poursuivie dans notre laboratoire autour de cinq thèmes principaux :

1. La structure du récepteur de l'acétylcholine préparé à partir de l'organe électrique de *Torpedo marmorata*, sous ses formes purifiées en détergent et liées à la membrane sous-synaptique, en particulier le repli tri-dimensionnel et l'organisation transmembranaire de ses chaînes polypeptidiques.

2. Les interactions allostériques et les transitions conformationnelles du récepteur lié à la membrane sous-synaptique.

3. L'agrégation et la stabilisation du récepteur de l'acétylcholine dans la membrane post-synaptique au cours du développement.

4. L'identification de facteurs d'extension des neurites agissant sur les

neurones spinaux d'embryon de poulet et la régulation de leur production par les cellules musculaires.

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 légères et lourdes du récepteur de l'acétylcholine

(BON *et al.*, 1984)

La forme légère L ($\alpha_2 \beta \gamma \delta$) de la protéine réceptrice de l'acétylcholine se présente au microscope électronique sur des vues de face et après coloration négative comme une rosette d'un diamètre de 8-9 nm avec un puits central de 1,5-2 nm (CARTAUD *et al.*, 1973 ; NICKEL et POTTER, 1973 ; KLYMKOVSKY et STROUD, 1979 ; ZINGSHEIM *et al.*, 1980). Dans les mêmes conditions, la forme lourde dimérique est identifiée à une paire coplanaire ou « doublet » de rosettes L (CARTAUD *et al.*, 1980 ; LINDSTROM *et al.*, 1980 ; WISE *et al.*, 1981 ; KISTLER *et al.*, 1982 ; BARRANTES, 1982). L'analyse d'image des deux rosettes d'une même forme H révèle une variabilité dans l'orientation relative de ces rosettes. Cette variabilité suggère une flexibilité de l'association par les chaînes δ (BON *et al.*, 1982 ; 1984) (STROUD et ses collaborateurs ont confirmé récemment cette conclusion). Sur cette base, les rosettes L ont pu être orientées dans la même position, mises en phase et sommées. Il en résulte une amélioration significative de la résolution des images. En accord avec une organisation pentamérique de la molécule, cinq pics inégaux ont été distingués pour la première fois au sein de la rosette L (BON *et al.*, 1982 ; 1984).

Cette année, les images moyennées du récepteur de l'acétylcholine ont été comparées avant et après marquage avec l' α -bungarotoxine (BON *et al.*, 1984). A la plus haute résolution accessible, les cinq pics sont encore observés à la même position. Toutefois, à la résolution limite de $1/2 \text{ nm}^{-1}$, seules les trois masses principales se distinguent encore sur la rosette non marquée ; par contre, les cinq pics demeurent visibles après saturation avec l' α -bungarotoxine. Les deux pics mineurs se trouvent donc renforcés par l' α -toxine et, en accord avec les observations de ZINGSHEIM *et al.*, 1982 (voir également HOLZMAN *et al.*, 1982), correspondent bien aux sous-unités α . Les deux chaînes se trouvent à « 13 heures » et à « 18 heures » et sont sous-tendues par un angle de 160° environ. La coopérativité observée entre les sites portés par chaque chaîne α a donc lieu entre chaînes non adjacentes.

I.B. *Identification des structures génomiques codant pour la sous-unité α*
(KLARSFELD *et al.*, 1984)

A la suite de l'isolement de clones ADNc codant pour la sous-unité α du récepteur de *T. marmorata* (GIRAUDAT *et coll.*, 1982 ; SUMIKAWA *et coll.*, 1982) et pour les quatre sous-unités de *T. californica* (BALLIVET *et coll.*, 1982 ; NODA *et coll.*, 1982 ; 1983 a, b), la séquence d'acides aminés complète des quatre sous-unités de *T. californica* (NODA *et coll.*, 1982 ; 1983 a, b ; CLAUDIO *et coll.*, 1983) et de la sous-unité α chez *T. marmorata* (DEVILLERS-THIÉRY *et coll.*, 1983) ont été établies.

Cette année, les structures génomiques codant pour la sous-unité α ont été analysées par la méthode d'hybridation par transfert de Southern avec des sondes ADNc radioactives isolées précédemment dans ce laboratoire (GIRAUDAT *et coll.*, 1982 ; DEVILLERS-THIÉRY *et coll.*, 1983) à partir de l'organe électrique de *T. marmorata*. Quatre sondes radioactives correspondant à différentes parties de l'ARNm de la sous-unité α , hybrident à plusieurs fragments génomiques de l'ADN de *T. marmorata* obtenus par digestion avec les enzymes de restriction SstI, PvuII et PstI. Le même tableau d'hybridation est obtenu après lavage des gels dans des conditions de stringence haute et basse. Sans ambiguïté, deux de nos sondes (l'une d'entre elles entièrement dans la région codante) hybrident à un fragment génomique unique de l'ADN de *T. marmorata*. Ce résultat, ainsi que l'ensemble des données d'hybridation, montrent qu'un gène unique code pour la sous-unité α dans le génome de *T. marmorata*. Puisque, au total, plus de bandes ont été trouvées que celles attendues à partir de la séquence de l'ADNc le gène codant pour la sous-unité α doit être morcelé et scindé par plusieurs introns (au moins quatre, vraisemblablement plus). La longueur de ce gène est au moins de 20 kb. L'existence d'un seul gène codant pour la sous-unité α est en accord avec l'absence l'hétérogénéité chimique de la séquence NH₂ terminale de la sous-unité purifiée et s'accorde également avec le point de vue suivant lequel les deux chaînes α appartenant à un même oligomère de récepteur ont des structures primaires identiques.

I.C. *Restauration lipide-dépendante de la liaison d' α -bungarotoxine et d'anticorps monoclonaux à la sous-unité α purifiée*
(TZARTOS et CHANGEUX, 1984)

Une méthode particulièrement puissante qui devrait permettre de comprendre le rôle joué par chaque sous-unité au sein de l'oligomère $\alpha_2\beta\gamma\delta$ est de disperser ses sous-unités et de les réassembler de manière reproductible en molécule fonctionnelle. MEUNIER *et coll.* (1972) mentionnaient déjà que la capacité de lier la toxine α de venin de serpent pouvait être conservée

après dispersion du récepteur d'*Electrophorus electricus* en sous-unités de plus petit poids moléculaire par le dodecyl sulfate de sodium (SDS). HAGGERTY et FROEHNER (1981) observaient également que la sous-unité α isolée par électrophorèse en gel dénaturant lie l' α -bungarotoxine ($K_D \sim 0,2 \mu\text{M}$) après élimination du SDS. Plus récemment, il a été montré (TZARTOS et CHANGEUX, 1983) que de faibles concentrations de SDS accroissent de manière spectaculaire la liaison d' α -bungarotoxine (voir rapport 1982) à la sous-unité α mais pas aux sous-unités β , γ ou δ purifiées dans les mêmes conditions. D'autre part, les détergents non-dénaturants comme le cholate de sodium, le Triton X-100 ont des effets opposés. La plupart des anticorps monoclonaux obtenus par TZARTOS et LINDSTROM (1980) et TZARTOS *et coll.* (1981 ; 1982) à partir de rats immunisés contre la sous-unité α dénaturée (anticorps monoclonaux n° 2, 6, 47, 50) se fixaient faiblement sur la chaîne α renaturée mais néanmoins de manière plus forte que ceux qui se lient à la sous-unité α dénaturée et réduite de *T. californica* (TZARTOS et LINDSTROM, 1980 ; GULLICK et LINDSTROM, 1982).

Cette année (TZARTOS et CHANGEUX, 1984), une amélioration substantielle de la méthode de renaturation de la sous-unité α purifiée en SDS a été obtenue en diluant celle-ci dans 1 % de lipides (asolectine) contenant 0,5 % de cholate de sodium (TZARTOS et CHANGEUX, 1984). Après élimination du détergent par une résine échangeuse d'ions, la sous-unité stabilisée par les lipides présente une affinité très élevée pour l' α -bungarotoxine ($K_D \sim 0,5 \mu\text{M}$). La carbamylcholine, agoniste monoquaternaire et l'hexamethonium, antagoniste bisquaternaire, entrent efficacement en compétition avec la toxine α . De plus, les bloquants non-compétitifs, meproadifen, trimethisoquin, phencyclidine et dans une certaine mesure, le decamethonium (connu pour posséder à la fois des propriétés agonistes et bloquantes non-compétitives) accroissent la liaison d' α -bungarotoxine, ce qui suggère que la sous-unité α possède, chez *T. marmorata*, un site de liaison de ces effecteurs allostériques (voir OSWALD et CHANGEUX, 1981 ; HEIDMANN *et coll.*, 1983). Egaleme nt, la réactivité de plusieurs anticorps monoclonaux contre la région immunogénique principale, un segment de la chaîne particulièrement sensible à la conformation, était récupéré avec cette sous-unité stabilisée par les lipides.

Les peptides de 34 000 et 27 000 Dalton obtenus par traitement de la sous-unité purifiée par la papaine conservent cette liaison d' α -bungarotoxine lipide dépendante. Par contre, l'accroissement de cette liaison par les bloquants non compétitifs est perdu avec le peptide de 27 000 Dalton. Aussi, la liaison des anticorps dirigés contre la région immunogénique principale disparaît avec les peptides 34 000 et 27 000 Dalton renaturés en présence de lipides. Des contraintes sur le repliement de la sous-unité α dénaturée s'exercent donc au niveau de la chaîne polypeptidique.

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

Le modèle le plus plausible d'organisation transmembranaire du récepteur de l'acétylcholine postule que le site de liaison des agonistes et le canal ionique appartiennent à des domaines différents de la molécule de récepteur, respectivement : les chaînes α et un canal axial commun aux cinq sous-unités (voir DEVILLERS-THIÉRY *et coll.*, 1983 ; NODA *et coll.*, 1983 b ; CLAUDIO *et coll.*, 1983, et CHANGEUX, 1981 ; KISTLER *et coll.*, 1982). La régulation de ces états d'ouverture du canal ionique par l'acétylcholine serait donc indirecte, ou allostérique, et transmise par une (ou plusieurs) transition(s) conformationnelle(s) de la molécule de récepteur (voir MONOD *et coll.*, 1963 ; 1965 ; CHANGEUX, 1981 ; CHANGEUX *et coll.*, 1983).

Cette année, les propriétés du récepteur membranaire qui s'y rapportent ont été étudiées par des méthodes de mélange rapide dans les deux conditions suivantes :

II.A. Corrélation entre la liaison de l'agoniste fluorescent Dns C6 Cho et l'état d'ouverture du canal ionique dans le domaine de temps de la milliseconde-seconde

(HEIDMANN *et coll.*, 1983 b)

La réponse de perméabilité ionique de fragments de membranes riches en récepteur se mesure *in vitro* en suivant le transport d'ions perméants soit radioactifs, soit identifiables par des méthodes spectroscopiques (KASAI et CHANGEUX, 1971 ; POPOT *et coll.*, 1976 ; MOORE et RAFTERY, 1981). Son analyse dans l'échelle de temps de la milliseconde-seconde par une technique de mélange rapide et de blocage de flux (HESS *et coll.*, 1979, 1981 ; NEUBIG et COHEN, 1980 ; NEUBIG *et coll.*, 1982) révèle une cascade d'étapes qui inclut : l'ouverture rapide du canal ou activation, suivie d'une désensibilisation en deux étapes (WALKER *et coll.*, 1981 ; 1982 ; HESS *et coll.*, 1982). D'autre part, les cinétiques rapides de liaison suivies dans une échelle de temps semblable avec des agonistes fluorescents (HEIDMANN et CHANGEUX, 1979, 1980) ou radioactifs (BOYD et COHEN, 1980 ; NEUBIG *et coll.*, 1982) ont été résolues sous la forme d'une séquence de transitions réversibles entre plusieurs conformations qui diffèrent par leur affinité vis-à-vis des agonistes. Un minimum de quatre états R, A, I, D, a été distingué sur la base de leur constante de dissociation pour les agonistes fluorescents Dns C6 Cho (et acétylcholine) : 50 μ M (R et A), 1 μ M (I) et 3nM (D) respectivement (HEIDMANN et CHANGEUX, 1980).

Cette année (HEIDMANN *et coll.*, 1983 b), les cinétiques rapides de liaison de Dns C6 Cho ont été comparées avec le développement dans le temps de la réponse de perméabilité déterminée, en parallèle, sur les mêmes fragments de membranes et dans la même échelle de temps (milliseconde-seconde). Les données montrent que, en accord avec les enregistrements physiologiques (voir SACKMANN *et coll.*, 1981), la liaison aux conformations de faible affinité (R et A) coïncide avec l'ouverture du canal ionique ou activation. D'autre part, la stabilisation des conformations de haute affinité : I (1 μ M) et D (3 nM) coïncide avec les étapes de désensibilisation rapide et lente de la réponse de perméabilité. Donc, dans les états I et D, le canal est fermé.

II.B. Marquage par irradiation UV de la chlorpromazine ^3H aux sous-unités du récepteur de l'acétylcholine en présence d'agonistes résolu dans l'échelle de temps de la milliseconde à la seconde

(HEIDMANN et CHANGEUX, 1984)

La chlorpromazine fait partie du groupe des bloquants non compétitifs (revue dans HEIDMANN *et coll.*, 1983 a) qui, sur la base d'un nombre important d'enregistrements électrophysiologiques *in vivo* et de mesures *in vitro*, ont été postulées entrer dans le canal ionique et inhiber à ce niveau le transport des ions par empêchement stérique (revue dans ADAMS, 1981). Dans les conditions d'équilibre, la chlorpromazine ^3H se lie de manière réversible à plusieurs catégories de sites présents sur le récepteur membranaire. La plus importante de ces catégories 1) montre une affinité élevée pour la toxine de grenouille histrionicotoxine et pour l'hallucinogène phencyclidine, 2) est réglée de manière allostérique par des agonistes cholinergiques et des antagonistes compétitifs et 3) se compose d'un seul site par forme L de récepteur (revue HEIDMANN *et coll.*, 1983 a). L'irradiation UV de ce site de haute affinité lorsqu'il est occupé de manière sélective par la chlorpromazine ^3H (OSWALD et CHANGEUX, 1981 ; HEIDMANN *et coll.*, 1982, 1983 a), entraîne l'incorporation de radioactivité dans les quatre chaînes du récepteur (HEIDMANN *et coll.*, 1982, 1983).

Les transconformations du récepteur de l'acétylcholine affectent la liaison des bloquants non-compétitifs au même titre que celle des agonistes. Les études de liaison d'histrionicotoxine (ARONSTAM *et coll.*, 1981) et de phencyclidine (OSWALD *et coll.*, 1983) ont mis en évidence une association rapide mais non résolue de ces bloquants non compétitifs à un état transitoire du récepteur peuplé sélectivement par les agonistes cholinergiques mais pas par les antagonistes compétitifs. Egalement des expériences antérieures de mélange rapide avec un bloquant non compétitif fluorescent, la quinacrine, ont révélé un accroissement de fluorescence rapide propre aux agonistes cholinergiques (GRUNHAGEN *et coll.*, 1977).

Cette année (HEIDMANN et CHANGEUX, 1984), un appareillage d'irradiation U.V. dans les conditions de mélange rapide a été mis au point pour résoudre les cinétiques d'association de la chlorpromazine ^3H avec le récepteur membranaire et pour marquer par photo-irradiation ses sous-unités dans le domaine de temps de 100 millisecondes à quelques secondes. Le mélange rapide de l'acétylcholine et de la chlorpromazine ^3H avec les membranes riches en récepteur suivi d'une irradiation U.V. brève (20 msec) met en évidence un processus d'association bimoléculaire rapide proche d'un contrôle par diffusion. Cette association rapide de chlorpromazine ^3H n'est pas observée avec les antagonistes compétitifs d-turbocarine, flaxedil ou α -toxine. Sa vitesse initiale s'accroît en fonction des concentrations d'agoniste avec les caractéristiques suivantes : 1) des maxima de 0,6 pour la carbamylcholine, 0,2 pour le phenyltriméthylammonium, lorsqu'on prend 1 pour l'acétylcholine, 2) des constantes de dissociations apparentes de 30 μM , 400 μM ou 300 μM respectivement pour l'acétylcholine, le carbamylcholine et le phenyltriméthylammonium et 3) une forme sigmoïde (coefficients de Hill 1,1-1,3).

Dans les conditions où l'incubation avec l'acétylcholine entraîne la désensibilisation de la réponse, l'association rapide de chlorpromazine ^3H décroît, en parallèle, avec la fermeture du canal ionique. L'association rapide, agoniste-dépendante de chlorpromazine ^3H a donc lieu au niveau du site commun aux cinq sous-unités. Ce site devient accessible quand le canal s'ouvre et il se trouve donc situé à proximité, ou peut-être fait partie, du canal ionique.

III. ÉVOLUTION DU RÉCEPTEUR DE L'ACÉTYLCHOLINE PENDANT LA FORMATION DE LA SYNAPSE

Dans la synapse électromotrice et la jonction neuromusculaire adulte, le récepteur de l'acétylcholine forme des agrégats immobilisés et denses, avec un temps de demi-vie métabolique long de plus de dix jours, et un temps moyen d'ouverture du canal bref (environ 1 msec). Par contre, chez l'embryon, avant l'arrivée des fibres nerveuses, le récepteur de l'acétylcholine présente un mouvement de translation rapide, un temps de renouvellement métabolique également rapide (demi-vie 18 heures) et dans quelques systèmes, un temps moyen d'ouverture du canal ionique long (revue FAMBROUGH, 1979 ; CHANGEUX, 1981). Puisque, au moins dans le cas de *Torpedo*, un gène chromosomique unique code pour la sous-unité α du récepteur de l'acétylcholine (KLARSFELD *et coll.*, 1984) (voir I.B.), les différences entre récepteurs embryonnaire et adulte doivent être « épigénétiques » (CHANGEUX et DANCHIN, 1976) et résultent soit : 1) de modifications covalentes *intrinsèques* de la molécule et/ou 2) de différences *extrinsèques* dans l'environnement membranaire local dues soit à des lipides soit à des protéines périphériques liées au cytosquelette et/ou à la lame basale, soit aux deux.

II.A. *Production et caractérisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le polypeptide 43 000 v_1 de T. marmorata*

(NGHIEM *et coll.*, 1983)

Les protéines 43 000 (SOBEL *et coll.*, 1977, 1978) font partie d'un groupe de polypeptides associés au récepteur de l'acétylcholine dans la membrane sous-synaptique. L'élimination de ces protéines par bref traitement à pH 11 conserve les propriétés fonctionnelles du récepteur de l'acétylcholine qui reste membranaire (NEUBIG *et coll.*, 1979), mais dont la susceptibilité à l'inactivation thermique (SAITOH *et coll.*, 1979), à la digestion par des enzymes protéolytiques (KLYMKOWSKY *et coll.*, 1980) ainsi que le mouvement de rotation (ROUSSELET *et coll.*, 1979, 1982), s'accroissent. La protéine 43 000 joue donc un rôle « structural » dans la membrane sous-synaptique.

L'analyse en gel d'électrophorèse à deux dimensions des protéines 43 000 révèle trois formes isoélectriques (SAITOH et CHANGEUX, 1980) nommées v_1 , v_2 et v_3 (GYSIN *et coll.*, 1981). De ces trois formes, seule v_1 reste liée à la membrane après purification.

Cette année, afin de clarifier le rôle de chacun de ces peptides, des anticorps monoclonaux ont été développés contre les protéines 43 000 dans la souris CBA. L'un d'entr'eux s'est trouvé réagir exclusivement avec le polypeptide v_1 mais pas avec les polypeptides v_2 et v_3 (NGHIEM *et coll.*, 1983). Après coloration immuno-cytochimique à l'or et à la peroxidase, les observations au microscope électronique montrent que l'anticorps monoclonal marque exclusivement la membrane innervée de l'électrocyte de *T. marmorata* sur sa face cytoplasmique. D'un point de vue qualitatif, le marquage par l'anticorps monoclonal anti v_1 suit de près les aires de la membrane post-synaptique où le récepteur de l'acétylcholine forme des agrégats denses. Des gels de transfert en une dimension de préparation de membranes d'organe électrique d'embryons de 80 mm, indiquent qu'à ce stade, où les synapses électromotrices sont fonctionnelles mais encore immatures, le polypeptide v_1 (ou un peptide proche) est présent.

III.B. *Relations entre le polypeptide 43 000 v_1 et le cytosquelette sous-neural*
(CARTAUD *et al.*, 1983, 1984)

Après pontage des fragments de membrane riches en récepteur de *T. marmorata* avec un réactif bifonctionnel, le bromure de para-azido phénacyle, v_1 forme des co-agrégats de poids moléculaire élevé. Lorsque le culot résiduel est traité par le Triton- X100 et observé par contraste négatif au microscope électronique, des filaments de taille variée (5 à 18 nm) apparaissent. Cette observation suggère qu'une relation structurale existe entre v_1 et le cytosquelette sous-neural (CARTAUD *et al.*, 1982).

Cette année, des contacts entre « filaments intermédiaires » de 10 nm et le cytosquelette ont été démontrés au niveau de la membrane post-synaptique *in situ* sur des sections transversales de l'électrocyte de *T. marmorata*. Des fragments de membrane riches en récepteur ont ensuite été marqués avec l'anticorps monoclonal anti v_1 , colorés à l'or et examinés au microscope électronique après contraste négatif. Dans ces conditions, les filaments intermédiaires ne sont jamais marqués par l'anticorps sauf à leur extrémité. Cela suggère que v_1 (comme l'ankyrine dans la membrane d'érythrocyte) sert de pièce intermédiaire dans l'immobilisation et l'ancrage des molécules de récepteur au cytosquelette sous-neural (CARTAUD *et coll.*, 1983, 1984).

III.C. Spectroscopie Raman des fragments de membrane riches en récepteur de *T. marmorata* : importance des polypeptides 43 000

(ASLANIAN *et coll.*, 1983)

L'organisation statique et dynamique des divers composants moléculaires des fragments de membranes riches en récepteur a été explorée dans le passé par un grand nombre de méthodes spectroscopiques comme la diffraction aux rayons X (DUPONT *et coll.*, 1974 ; ROSS *et coll.*, 1977), la résonance de spin (références dans ROUSSELET *et coll.*, 1982), la polarisation de fluorescence (BARTHOLDI *et coll.*, 1981) ou la phosphorescence (LO *et coll.*, 1980).

Cette année, les premières données de spectroscopie Raman ont été obtenues à partir de fragments de membranes riches en récepteur (ASLANIAN *et coll.*, 1983). La méthode paraît bien adaptée à l'exploration de plusieurs caractéristiques structurales de ces fragments de membranes et de leurs composants. En particulier, la spectroscopie Raman révèle un contenu élevé en hélices α dans le cas du récepteur de l'acétylcholine et de conformation au hasard dans le cas des protéines 43 000 isolées. Il indique également que la solubilisation du récepteur par le détergent non-dénaturant DDAO entraîne l'exposition des résidus tyrosine et tryptophane. L'analyse des vibrations caractéristiques des lipides confirment de plus que, dans la membrane native, le rapport lipide-protéine est particulièrement bas et que l'état des lipides membranaires change après extraction de la protéine 43 000. Elle montre également que après solubilisation et purification en présence du détergent DDAO, des lipides restent associés à la protéine réceptrice.

IV. IDENTIFICATION DE FACTEURS D'EXTENSION DES NEURITES AGISSANT SUR LES NEURONES SPINAUX D'EMBRYONS DE POULET ET RÉGULATION DE LEUR PRODUCTION PAR LES CELLULES MUSCULAIRES

(HENDERSON *et coll.*, 1983, 1984)

Des facteurs « rétrogrades » libérés par les cellules musculaires ont été postulés jouer un rôle critique dans la croissance et la stabilisation sélective des axones moteurs pendant la mise en place de l'innervation adulte (CHANGEUX et DANCHIN, 1976 ; VARON et BUNGE, 1978 ; HENDERSON, 1982 ; GOUZÉ *et coll.*, 1983). Un milieu *conditionné* sur des myotubes d'embryons de poulet a été montré stimuler *in vitro* l'extension de neurites à partir de cellules dissociées en culture provenant de tubes nerveux d'embryons de poulet de quatre jours et demi (HENDERSON *et coll.*, 1981).

Cette année, en utilisant la même méthode de dosage, il a été montré que des *extraits* de muscles de poussin contiennent une activité qui favorise la croissance des neurites (HENDERSON *et coll.*, 1983, 1984). Les molécules responsables de ces activités dans les extraits et dans le milieu conditionné présentent des propriétés physico-chimiques différentes. Le facteur du milieu conditionné bien que actif sur des boîtes de culture non traitées ne se lie pas à celles-ci dans les conditions de culture. Il est inactivé par incubation avec la trypsine et se trouve essentiellement dans les milieux conditionnés par des cellules musculaires ou hépatiques. Le facteur des extraits musculaires, par contre, se lie aux boîtes de culture en plastique, est plus résistant aux concentrations élevées de trypsine et se rencontre dans des extraits d'un grand nombre de tissus. Sa concentration dans les muscles de la patte de poussin évolue au cours du développement. Son activité spécifique croît approximativement dix fois entre l'éclosion et le troisième jour de vie post-natale (valeur maximum 3 200 unités par milligramme de protéine) puis décroît jusqu'à son niveau initial au septième jour suivant l'éclosion (HENDERSON *et coll.*, 1984).

Fait important, lorsque des poussins de six jours sont dénervés par section du nerf sciatique, l'activité spécifique du facteur présent dans l'extrait musculaire s'accroît en moyenne quinze fois, trois jours après l'innervation. La production de ce facteur est donc réglée par innervation du muscle. En plus de ces implications théoriques, cette observation est d'intérêt pratique car elle permet d'obtenir des grandes quantités de facteurs en vue de sa purification.

V. PHÉNOMÈNES RÉGRESSIFS ACCOMPAGNANT LA SYNAPTOGENÈSE DANS LE CERVELET DE RAT ET DE SOURIS

Un phénomène d'élimination synaptique spontanée a lieu au cours du développement de la jonction fibres grimpantes-cellule de Purkinje dans le cervelet de rat (CRÉPEL *et coll.*, 1976 ; MARIANI et CHANGEUX, 1981 a, b). L'étude de ce phénomène a été poursuivie cette année.

a) *Etude quantitative des neurones de l'olive bulbaire*

(DELHAYE-BOUCHAUD *et coll.*, 1984 ; SHOJAEIAN *et coll.*, 1984)

La régression des contacts surnuméraires entre fibres grimpantes et cellules de Purkinje peut être due soit à une simple régression de collatérales d'axones, soit à une mort cellulaire d'éléments présynaptiques, c'est-à-dire de neurones olivaires.

Pour distinguer entre ces deux possibilités, le nombre total de neurones par olive a été compté sur des coupes sériées chez le raton, de la naissance jusqu'à l'état adulte. L'évolution de ce nombre est biphasique. D'abord, il décroît légèrement (25 %) jusqu'au 5^e jour post-natal (c'est-à-dire au jour du maximum de multi-innervation), puis, en apparence, s'accroît progressivement jusqu'à des valeurs chez l'adulte voisines de celles observées à la naissance. Aucune explication satisfaisante pour cette remontée n'a encore été trouvée.

Pour s'affranchir de cette phase de croissance apparente du nombre de neurones, des comptages ont été effectués dans l'olive inférieure de souris mutantes *weaver*, *reeler* et de rats irradiés aux rayons X chez lesquels l'innervation multiple se maintient chez l'adulte (revue MARIANI, 1982, 1983). Aucune différence significative n'a été notée avec des animaux témoins du même âge. La mort cellulaire précoce ne joue donc pas (ou peu) de rôle au cours du phénomène d'élimination synaptique.

b) *Etude des cartes de projection de la périphérie sur le cortex cérébelleux par la voie des fibres grimpantes*

(MULLE *et coll.*, 1984 ; MARIANI *et coll.*, 1984)

Afin de comprendre la signification fonctionnelle de la régression synaptique, une étude systématique des cartes de projections de plusieurs afférentes périphériques sur le cortex cérébelleux par la voie des fibres grimpantes a été entreprise et les cartes obtenues comparées chez l'animal à cellules de Purkinje multi-innervées et chez l'animal à cellules de Purkinje mono-innervées. La

réponse évoquée via les fibres grimpantes est enregistrée dans les cellules de Purkinje d'un lobe cérébelleux convenablement choisi après stimulation des deux nerfs sciatiques, du museau, des deux pattes antérieures et de la queue. La position précise de toutes les cellules enregistrées est repérée par marquage, et reportée sur un atlas établi à partir d'une série de coupes sagittales de cervelet de rat. Plusieurs centaines de cellules ont été enregistrées pour chaque situation expérimentale (mono ou multi-innervée).

Le traitement de cet ensemble de données a nécessité la mise au point d'une banque de données informatiques avec clefs de sélection permettant de réaliser automatiquement les histogrammes et les cartes choisies. La cartographie détaillée des lobules VII et VIII dans leur portion médiane a été réalisée chez le rat adulte normal et comparée à la carte des zones correspondantes chez des rats adultes agranulaires où chaque cellule de Purkinje reçoit plusieurs fibres grimpantes.

Des zones précises (« patches ») de réponse ont pu être décrites pour la stimulation du nerf trijumeau contralatéral, de la queue et des pattes antérieures et une étude exhaustive des convergences éventuelles effectuée chez **les rats normaux et agranulaires**. La comparaison précise de ces deux situations suggère que, dans les conditions de stimulation utilisées, la régression de la multi-innervation ne paraît pas jouer un rôle majeur dans la mise en place des zones de projection de l'adulte.

c) *Etude de la représentation des vibrisses dans le lobule VII par la voie des fibres grimpantes chez le rat adulte normal*

(JABER, DELHAYE-BOUCHAUD, et MARIANI, non publié)

Les réponses à la stimulation mécanique calibrée d'une rangée de vibrisses ont été étudiées dans la portion médiane et controlatérale du lobule VII où nous avons enregistré des réponses à la stimulation électrique du nerf trijumeau (MULLE *et coll.*, 1983, 1984). Les premiers résultats de ce travail mettent en évidence une représentation sagittale extrêmement localisée et ordonnée dans cette zone. Ce travail sera poursuivi l'année prochaine par l'analyse de la représentation d'autres rangées de vibrisses et par la définition des champs récepteurs périphériques après stimulation de vibrisses individuelles.

d) *Stabilité de l'innervation multiple chez les rats adultes agranulaires*

(P. BENOIT *et coll.*, 1984)

Afin de vérifier la stabilité de l'innervation multiple persistante chez les animaux agranulaires, des animaux irradiés ont été étudiés à l'âge de 15-

18 mois. Le nombre moyen de fibres grimpantes par cellule de Purkinje ne diffère pas de celui de jeunes adultes de 1-3 mois (soit 2,5 fibres en moyenne) rendus agranulaires suivant le même protocole.

e) *Amélioration du modèle « rat irradié »*

Le protocole d'irradiation classique (ALTMAN, 1972) comporte 6 à 7 irradiations de 150 rats chacune répartie du jour zéro au jour 15 après la naissance. Ce protocole n'empêche pas la disparition d'une fibre grimpante en moyenne par cellule de Purkinje (2,5 fibres/cellule contre 3,5 au moment de la multi-innervation maximale chez le raton. Par ailleurs, il en résulte des perturbations morphométriques importantes (cellules de Purkinje en plusieurs couches) qui rendent difficile la comparaison des cartes avec celles du rat normal.

Nous avons essayé d'améliorer ce modèle en effectuant des irradiations partielles concentrées sur une période critique éventuelle. Une augmentation notable du degré de multi-innervation a été obtenue (3 fibres en moyenne) en se limitant à des irradiations du 4^e au 7^e jour.

PUBLICATIONS

1983

(suite)

J. CARTAUD, C. KORDELI, H. NGHIÊM et J.-P. CHANGEUX, *La protéine 43,000 dalton : pièce intermédiaire assurant l'ancrage du récepteur cholinergique au cytosquelette sous-neural* (C.R. Acad. Sci., Paris, 297, 285-289).

D. ASLANIAN, T. HEIDMANN, M. NEGRERIE et J.-P. CHANGEUX, *Raman spectroscopy of acetylcholine receptor-rich membranes from Torpedo marmorata and of their isolated components* (F.E.B.S. Letters, 164, 393-400).

J.-P. CHANGEUX, *Remarques sur la complexité du système nerveux et sur son ontogénèse* (In : *Information et Communication*, Editions Maloine, Paris, A. Lichnerowicz, F. Perroux, G. Gadoffre, eds., 131-152).

J.-P. CHANGEUX, F. BON, J. CARTAUD, A. DEVILLERS-THIÉRY, J. GIRAUDAT, T. HEIDMANN, B. HOLTON, H. NGHIÊM, J.-L. POPOT, R. VAN RAPENBUSCH et S. TZARTOS, *Allosteric properties of the acetylcholine receptor protein from Torpedo marmorata* (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 48, 35-52).

T. HEIDMANN, J. BERNHARDT, E. NEUMANN et J.-P. CHANGEUX, *Rapid kinetics of agonist binding and permeability response analysed in parallel on acetylcholine receptor-rich membranes from Torpedo marmorata* (Biochemistry, 22, 5452-5459).

H. NGHIÊM, J. CARTAUD, C. DUBREUIL, G. BUTTIN et J.-P. CHANGEUX, *Production and characterization of a monoclonal antibody directed against the 43,000 MW ν_1 polypeptide from Torpedo marmorata electric organ* (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 8, 6403-6407).

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

J.-P. CHANGEUX, *L'Homme Neuronal*, 419 p., Paris, Fayard.

1984

H. SHOJAEIAN, N. DELHAYE-BOUCHAUD et J. MARIANI, *Neuronal death and synapse elimination in the olivo-cerebellar system. II. Cell counts in the inferior olive of adult X-irradiated rats and weaver and reeler mutant mice* (J. Comp. Neurol., soumis).

P. BENOÎT, N. DELHAYE-BOUCHAUD, J.-P. CHANGEUX et J. MARIANI, *Stability of multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the agranular cerebellum of old rats X-irradiated at birth* (Developmental Brain Research, 14, 310-313).

A. DEVILLERS-THIÉRY, J. GIRAUDAT, M. BENTABOULET, A. KLARSFELD et J.-P. CHANGEUX, *Molecular genetics of Torpedo marmorata acetylcholine receptor* (In : *Gene expression and cell-cell interactions in the developing nervous system*. J.M. Lauder, P. Nelson Eds., Plenum Press, N.Y., sous presse).

J.-P. CHANGEUX, T. HEIDMANN et P. PATTE, *Learning by selection* (Dahlem Konferenzen, « The biology of learning », P. Marler and H.S. Terrace ed. Springer-Verlag, Berlin, sous presse).

N. DELHAYE-BOUCHAUD, B. GEOFFROY et J. MARIANI, *Neuronal death and synapse elimination in the olivo-cerebellar system. I. Cell counts in the inferior olive of developing rats* (J. Comp. Neurol., soumis).

T. HEIDMANN et J.-P. CHANGEUX, *Time-resolved photolabeling by chorpromazine of the acetylcholine receptor ion channel in its transiently open and close conformations* (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 81, 1897-1901).

B. HOLTON, S. TZARTOS et J.-P. CHANGEUX, *Comparison of embryonic*

and adult Torpedo acetylcholine receptor by sedimentation characteristics and antigenicity (*Develop. Neurosc.*, sous presse).

S. TZARTOS et J.-P. CHANGEUX, *Lipid dependent recovery of α -bungarotoxin and monoclonal antibody binding to the purified α -subunit from Torpedo marmorata acetylcholine receptor* (*J. Biol. Chem.*, sous presse).

J. CARTAUD, C. KORDELI, H. NGHIÊM et J.-P. CHANGEUX, *The postsynaptic domain in Torpedo marmorata electric organ : Molecular architecture and stabilization mechanisms* (*In : Proceedings of the 10th Conference on Biological membrane, Crans-sur-Sierre, 1983. Transduction and energy transfer in Biological membranes*, sous presse).

J.-L. POPOT et J.-P. CHANGEUX, *The nicotinic acetylcholine receptor : structure of an oligomeric integral membrane protein* (*Physiol. Rev.*, sous presse).

A. KLARSFELD, A. DEVILLERS-THIÉRY, J. GIRAUDAT et J.-P. CHANGEUX, *A single gene codes for the nicotinic acetylcholine receptor α -subunit in Torpedo marmorata : structural and developmental implications* (*E.M.B.O. J.*, 3, 45-41).

F. BON, E. LEBRUN, J. GOMEL, R. VAN RAPENBUSCH, J. CARTAUD, J.-L. POPOT et J.-P. CHANGEUX, *Image analysis of the acetylcholine receptor heavy form* (*J. Mol. Biol.*, 176, 205-237).

C.E. HENDERSON, M. HUCHET et J.-P. CHANGEUX, *Neurite promoting activities for spinal neurons and their developmental changes in the chick* (*Dev. Biol.*, 104, 336-347).

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

Jean-Pierre CHANGEUX :

— Conférence Plénière au « Meeting of the International Narcotic Research Conference », Garmisch-Partenkirchen, R.F.A., 28 juin 1984.

— Conférence « Structure et fonction d'une protéine régulatrice membranaire : le récepteur de l'acétylcholine », C.E.A., Centre d'Etudes Nucléaires, Grenoble, 29 juin 1984.

— Symposium « Genetic and Epigenetic Interactions in Neural Development » au « 4th International Congress at the Society for Developmental Neuroscience », Salt Lake City, Utah, U.S.A., 3-7 juillet 1984.

— Symposium « 15th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies », Bruxelles, 29 juillet 1983.

— Symposium « XXIX Congress of International Union of Physiological Sciences », Sydney, Australie, 28 août - 3 septembre 1983.

— Conférence Plénière « 2nd Camerino Symposium : Recent Advances in Receptor Chemistry », Italie, 6 septembre 1983.

— Symposium, Congrès sur les Biotechnologies, Institut Pasteur, 8 septembre 1983.

— Symposium « Neurotransmitter Receptor International Symposium », Hiroshima, 6-8 octobre 1983.

— Séminaire « Le cerveau humain », Ecole Polytechnique, 17 novembre 1983.

— Participant, Dahlem Workshop on the Biology of Learning, Berlin, 23-28 octobre 1983.

— Conférence sur « Récepteur de l'acétylcholine, modèle de récepteur central », Laboratoire de Pharmacologie Médicale, Université d'Aix-Marseille, 18 novembre 1983.

— Conférence au Centre d'Etude des Systèmes et des Technologies Avancées, « La plasticité neuronale », Paris, 5 décembre 1983.

— Conférence au Mouvement contre le Racisme et pour l'Amitié des Peuples, « Apprentissage et développement du système nerveux », Paris, 10 décembre 1983.

— Conférence à l'Université Populaire du Rhin, « L'Homme Neuronal », Mulhouse, 12 décembre 1983.

— Conférence à l'A.R.S.O. (Art et Rencontre en Sud-Ouest), « Progrès récents dans la connaissance du cerveau », Bordeaux, 19 décembre 1983.

— Conférence au Séminaire Interdisciplinaire de l'Institut Collégial Européen, « La programmation de la recherche en neurobiologie moléculaire », Collège de France, 14 janvier 1983.

— Conférence à l'Université de Médecine et de Pharmacie, « Progrès récents de la Recherche sur le cerveau », Rouen, 23 février 1984.

— Conférence, University College, Dept of Anatomy and Embryology, « The structure and function of the acetylcholine receptor », Londres, 16 février 1984.

— N.R.P. Meeting, Rockefeller University, New York, 11-13 mars 1984.

— Conférence sur « Structure and function of the acetylcholine receptor protein », Irvine University, California, 14 mars 1984.

— Conférence « The acetylcholine receptor-channel », au California Institute of Technology, Pasadena, California, 15 mars 1984.

— Symposium « Membrane receptors and drug discovery », Imperial College, Londres, 5 avril 1984.

— Conférence, « The acetylcholine receptor : structure and properties of a membrane-bound "allosteric" protein », Scripps Clinic, La Jolla, Californie, U.S.A., 20 juin 1984.

Anne DEVILLERS-THIÉRY :

— Conférence au 4^e Congrès International sur la Biologie du Développement, Salt Lake City, U.S.A., juillet 1983.

— Conférence à Columbia University, New York, U.S.A., avril 1984.

— Séminaire au D.E.A. de Biochimie, Université Paris VI, avril 1984.

Jérôme GIRAUDAT :

— Conférence au Arcachon Neurobiology Meeting, Arcachon, 14 septembre 1983.

— Séminaire pour le DEA de Biologie Humaine, Faculté Pitié-Salpêtrière, Paris, 9 décembre 1983.

— Séminaire au Laboratoire d'Immunogénétique Cellulaire, Institut Pasteur, Paris, 29 février 1984.

— Séminaire pour le D.E.A. de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université de Paris VI, 27 avril 1984.

Thierry HEIDMANN :

— Conférence au 50^e Anniversaire de la Découverte de la Radioactivité Artificielle, C.E.A., Paris, 23 mars 1984.

Christopher HENDERSON :

— Séminaire à l'Unité I.N.S.E.R.M. 153, Paris, 17 juin 1983.

— Conférence au Colloque sur la Maladie de Parkinson, Collège de France, 18 juin 1983.

— Conférence et organisation du Colloque sur les Dysfonctions de la Corne Antérieure, Ministère de l'Industrie et de la Recherche, Paris, 21 juin 1983.

— Conférence au Symposium sur la Sclérose Latérale Amyotrophique, Munich, Allemagne, 14-15 octobre 1983.

— Séminaire à l'Institut d'Embryologie, Nogent-sur-Marne, 17 octobre 1983.

— Séminaire dans le cadre du cours du Professeur François Jacob, Collège de France, 19 octobre 1983.

- Séminaire, Yale University, New Haven, U.S.A., 2 novembre 1983.
- Séminaire, Harvard Medical School, Boston, U.S.A., 4 novembre 1984.
- Communication, « 13th Annual Meeting for Neuroscience », Boston, U.S.A., 4 novembre 1983.
- Séminaire, Cornell University, Ithaca, U.S.A., 14 novembre 1983.
- Séminaire, Washington University, St. Louis, U.S.A., 16 novembre 1983.
- Séminaire, University of California, San Francisco, U.S.A., 18 novembre 1983.
- Séminaire, Stanford University, Palo Alto, U.S.A., 21 novembre 1983.
- Séminaire, University of California, San Diego, U.S.A., 23 novembre 1983.
- Séminaire à l'I.N.S.E.R.M. U 43, Paris, 12 janvier 1984.
- Séminaire à l'Université d'Uppsala, Suède, 24 mai 1984.
- Conférence au Colloque Pasteur-Weizmann, Institut Weizmann, Rehovot, Israël, 29 mai 1984.
- Séminaire au Collège de France, 28 juin 1984.

Jean MARIANI :

- Séminaire à l'Université de Lausanne, 30 juin 1983.
- Conférence, Université Laval, Québec, 14 novembre 1983.
- Conférence, Friedrich Mischer Institut, Bâle, Suisse, 28 février 1984.
- Séminaire au Collège de France, 21 juin 1984.

DISTINCTIONS

Jean-Pierre CHANGEUX :

- Officier dans l'Ordre des Arts et des Lettres, octobre 1983.
- Correspondant étranger de l'Académie Royale de Médecine de Belgique, novembre 1983.
- Médaille d'or de la Société d'Encouragement au Progrès, Promotion 1983.
- Woodward Lecture, Yale University, « Molecular properties of the acetylcholine receptor », New Haven, Connecticut, U.S.A., 9 mars 1984.