

Communications cellulaires

M. Jean-Pierre CHANGEUX, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

A. COURS

Le cours de l'année 1995 intitulé « Récepteurs de neuromédiateurs et mécanismes d'apprentissage » est en continuité avec celui de l'année 1994 consacré principalement aux récepteurs liés aux canaux ioniques et à leurs propriétés interprétées dans le cadre d'un modèle allostérique concerté. Il a porté en priorité sur les récepteurs « serpentins » à 7 hélices transmembranaires liés aux protéines G puis à la contribution des diverses catégories de récepteurs de neuromédiateurs à des mécanismes élémentaires d'apprentissage.

Afin de situer avec clarté le niveau d'organisation — moléculaire et cellulaire — auquel les travaux présentés se réfèrent, une réflexion a été engagée, en introduction, sur l'organisation et la complexité du système nerveux central. En effet, le passage du moléculaire au cognitif comme la transition des fonctions psychologiques au social et à l'histoire des sociétés (Ignace Meyerson) ne peuvent être examinés convenablement dans une perspective évolutionniste sans prendre en compte ces deux notions.

On trouve déjà sous la plume de La Mettrie que « l'organisation est le premier mérite de l'homme » et que « toutes les facultés de l'âme dépendent tellement de la propre organisation du cerveau et de tout le corps qu'elles ne sont visiblement que cette organisation même... ». Dans ce contexte, le mot *organisation* s'oppose à désorganisé, sans forme, au hasard. Il tente de définir la disposition relative des éléments et leurs corrélations réciproques qui « composent » un ensemble cohérent et unifié possédant une fonction définie — ici, les fonctions psychologiques. Il porte sur la structure, les formes anatomiques stables qui déterminent les fonctions d'un système considéré. Spencer dans ses *Principes de psychologie* (1870) analyse l'« évolution nerveuse » en terme de développement de « coordinations entre groupes sensoriels et groupes moteurs... rendues plus complexes par l'introduction de nouveaux éléments combinés de diverses façons... compo-

sant des sphères d'étendues de plus en plus vastes pouvant devenir mentalement présentes ». Dans la même ligne de pensée, Hughling's Jackson développe une conception hiérarchique du fonctionnement du système nerveux. « L'évolution est le passage du plus simple vers le plus complexe, c'est-à-dire du centre bien organisé et inférieur vers les centres supérieurs moins bien organisés... et qui *s'organisent toute la vie...* ». C'est également le « passage du plus automatique au plus volontaire ». La *dissolution*, processus pathologique en sens inverse de l'évolution, « procède du plus fragile, du « moins organisé », du plus complexe, du moins automatique... dans la direction du plus résistant, moins complexe, plus automatique ». En d'autres termes, plus la complexité structurale est élevée, plus l'auto-organisation devient possible, plus l'autonomie de l'organisme vis-à-vis de son environnement devient importante. La position de Spencer se distingue de celle des phrénologues, mais il n'en « infère pas la fausseté absolue de leur théorie ». Il insiste sur la « coopération constante des centres nerveux principaux de chaque pensée, chaque émotion », plutôt que sur « la démarcation précise » des « territoires » ou « organes ». « Cette portion particulière du cerveau dans laquelle une faculté est dite située, doit être — selon lui — regardée comme une sorte d'agence par laquelle les diverses actions produites en maint autre point du cerveau sont combinés d'une manière spéciale ». Cette conciliation d'une spécialisation fonctionnelle de territoires définis du cortex cérébral et d'une interaction forte entre ceux-ci s'accorde avec la position de la neurobiologie contemporaine.

Au cours de l'évolution des vertébrés, le plan d'organisation du cerveau se conserve dans ses grandes lignes alors que les surfaces relatives engagées par les diverses aires corticales varient (Brodman). Des singes à l'homme, la surface relative et la différenciation des aires pariéto-temporales augmentent et la dominance hémisphérique s'accroît, en relation avec l'acquisition du langage ; le territoire occupé par les aires préfrontales s'accroît, en relation avec le développement des fonctions cognitives ; par contre, les surfaces des aires olfactives et visuelles décroissent relativement au reste du cortex cérébral. L'examen de l'empreinte des vaisseaux méningés sur la face interne du crâne (Saban) montre qu'au cours de l'évolution des ancêtres de l'homme, une réduction de surface des aires visuelles a lieu avec l'australopithèque ; un accroissement différentiel de la surface des aires frontales et pariétales, ainsi qu'une accentuation de l'asymétrie hémisphérique se manifeste avec *Homo habilis* ; la transition vers *Homo erectus* se produit par accroissement allométrique et renforcement de l'asymétrie ; enfin la complexité de la vascularisation augmente progressivement de *H. erectus* à *H. sapiens*, même si de *H. sapiens neanderthalensis* à *H. sapiens sapiens* la taille du cerveau décroît.

Le cortex cérébral se compose chez l'homme de 10 à 30 milliards de neurones, l'encéphale en comprend environ 100 milliards. S'il s'établit en moyenne 10 000 contacts synaptiques par neurone, il existe de l'ordre de 10^{15} synapses dans l'encéphale humain, soit environ 600 millions par mm^3 . Le nombre de combinaisons possibles, de l'ordre de 10 suivi de millions de zéro est, selon G. Edel-

man, « supérieur au nombre de particules chargées positivement dans l'Univers ». Lorsque l'on examine les fonctions supérieures du cerveau de l'homme, la richesse combinatoire du réseau neuronal cérébral ne doit jamais être sous-estimée, même si sa connectivité n'est pas totale.

Les relations de « convergence » et de « divergence » entre cellules nerveuses introduisent des contraintes au sein d'une connectivité qui n'est ni totalement au hasard (gaz), ni totalement régulière (cristal). G. Edelman définit sur cette base la « complexité » C_N comme mesure de l'information mutuelle entre les parties, comparée avec le reste, sommé sur toutes ses bipartitions totales ; celle-ci est élevée avec le cerveau qui réunit spécialisation locale et intégration globale, mais reste faible pour les systèmes composés de parties indépendantes ou de parties complètement couplées.

René Thom note que la notion de complexité est ambiguë et souvent « sert d'excuse à la paresse intellectuelle » (même si lui-même se répète abondamment à travers ses multiples ouvrages). Selon lui, sur le plan analytique, « la longueur de la suite des opérations nécessaires à la construction d'un objet (à partir de ses éléments dissociés) mesure sa "complexité" ». Sur le plan fonctionnel, la complexité porte sur la stabilité de l'objet, sur ses réactions aux stimuli extérieurs, sur le développement d'une performance d'un degré supplémentaire au niveau global (exemple l'avion en vol est plus « complexe » que l'ensemble des pièces détachées).

Concrètement, l'organisation des 32 aires visuelles du cortex cérébral du singe macaque, telle que nous la propose Fellman & Van Essen (1990), se réalise de manière à la fois parallèle et hiérarchique, avec seulement 305 types de connexions, soit 31 % (vraisemblablement 40 %) des connexions possibles. Si l'on inclut rétine, cortex entorhinal et hippocampe, cela correspond à 14 niveaux hiérarchiques, avec, pour chacun, au moins un relais synaptique. En plus des régulations entre niveaux, des systèmes de régulations globales, par exemple mésencéphale → cortex frontal, participent à une combinatoire fonctionnelle extrêmement élaborée entre aires. Aux régulations de « bas en haut », s'ajoutent des régulations « en boucles » de « haut en bas » qui, faisant appel à une importante activité spontanée, donnent au cerveau la capacité d'intervenir sur le monde suivant un mode *projectif* plutôt qu'« entrée-sortie ».

Prigogine a bien montré que les organismes vivants sont des « structures dissipatives » hors d'équilibre et dont la *distance* par rapport à l'équilibre est une mesure de l'organisation. Maupertuis, dès 1754, dans son « Essai sur la formation des corps organisés », montre que les êtres vivants manifestent deux tendances contradictoires, celle de « se reproduire et de se perpétuer par une sorte de mémoire » et celle de « dévier et changer au hasard, créant et détruisant de nouvelles formes ». Les organismes vivants sont donc capables d'exploiter l'aléatoire qui se manifeste dans leur environnement et à l'intérieur d'eux-mêmes, pour engendrer des formes nouvelles selon un principe « d'ordre à partir du bruit »

(von Foerster, Atlan). Mais, sur le plan logique, il ne peut y avoir auto-organisation que dans la mesure où le système n'est pas fermé mais « ouvert » sur son environnement (Ashby, Atlan).

Le modèle évolutionniste par variation-sélection-amplification s'applique à la transition entre niveaux hiérarchiques d'un être vivant quel que soit ce niveau (Popper, Changeux). Au cours de l'évolution s'élaborent des « représentations du monde » à des niveaux de plus en plus « abstraits » : au niveau génétique et stable de génération en génération, au niveau de la connectivité neuronale et épigénétique avec une stabilité qui est celle de l'individu, au niveau de la « mobilisation » fugace de cette connectivité lors du raisonnement et de la planification. Cette flexibilité de la connectivité neuronale introduit une « réserve d'aléatoire » qui assure l'évolution culturelle.

La structure et la fonction des récepteurs canaux, qui composent la fraction la plus importante des récepteurs de neuromédiateurs, ont été présentées en 1994. Quelques découvertes récentes sont venues, néanmoins, quelque peu bouleverser les idées reçues. Les observations de microscopie électronique à haute résolution du récepteur de l'acétylcholine de Torpille (Unwin, 1993, 1994) suggèrent qu'il n'existerait par sous-unité qu'*un seul* segment transmembranaire (vraisemblablement M2) enroulé en hélice α , les autres 3 segments transmembranaires possédant une structure supposée en feuillet β . Les résultats de marquage chimique non spécifique à partir de la phase lipidique membranaire effectués par Blanton et Cohen (1994) sont cependant compatibles avec l'organisation de M3 et M4 en hélices α . La question reste ouverte. Autres avancées de la connaissance dans le domaine des récepteurs-canaux : la démonstration d'une filiation évolutive entre les récepteurs anioniques du GABA et de la Glycine avec les récepteurs cationiques de la sérotonine (5HT₃) et de l'acétylcholine. L'ancêtre commun hypothétique aurait existé il y a 2,5 milliards d'années, vraisemblablement chez les procaryotes où des toxines pentamériques existent. Le récepteur cationique le plus ancien serait le récepteur de la sérotonine, puis viendraient les récepteurs neuronaux $\alpha 7$, $\alpha 8$ susceptibles de former des homo-oligomères fonctionnels. Le récepteur anionique le plus ancien serait celui de la glycine. Dans l'un et l'autre cas, la formation d'hétéro-oligomères serait tardive. Elle serait à l'origine de la différenciation des sites des benzodiazépines dans le cas du récepteur du GABA.

Le résultat récent le plus remarquable dans le domaine des récepteurs-canaux est la démonstration d'organisations transmembranaires différentes de celles du récepteur nicotinique : d'une part, dans le cas du récepteur de l'ATP extracellulaire, deux segments transmembranaires, une boucle P de type canal K⁺ et les groupes amino- et carboxyterminaux exposés à la face cytoplasmique (Antony et coll., 1994 ; Valera et coll., 1994), d'autre part, dans le cas des récepteurs du glutamate avec trois segments transmembranaires, une boucle P, et l'acide aminé NH₂-terminal synaptique et le groupe COOH-terminal cytoplasmique (Wo et

Oswald, 1994 ; Heinemann et coll., 1994). Enfin, témoignage d'un étonnant « bricolage évolutif », on retrouve une très forte analogie de séquence entre le site de liaison du glutamate et la protéine bactérienne périplasmique liant la glutamine (30 à 50 % d'identité sur 150 acides aminés).

Les récepteurs à 7 hélices transmembranaires composent une famille extrêmement vaste de molécules dont les connaissances que nous en avons proviennent, d'une part, de travaux sur la bactériorhodopsine d'*Halobacterium halobium* et, d'autre part, de recherches sur la rhodopsine et les récepteurs de neuromédiateurs (et d'hormones) liés à des protéines G.

La bactériorhodopsine sert de pompe à protons mue par la lumière dans la bactérie halophyte très primitive *H. halobium*. Mise en présence d'eau distillée la bactérie éclate et libère des fragments de membrane de couleur pourpre qui se purifient facilement et se composent, en plus des lipides, d'une seule espèce protéique de masse moléculaire 26 000 (248 acides aminés) avec une molécule de rétinol par 26 000 daltons. A l'obscurité, le rétinol est sous la forme tout-*trans* et forme une base de Schiff avec la protéine au niveau de la lysine 216. A la lumière, le rétinol s'isomérisé en moins de 10 psec sous la forme 13 *cis* (état K 625), puis revient dans l'état initial, à l'obscurité, en formant un cycle avec plusieurs intermédiaires : K 625 → L550 avec libération de proton, à partir de la base de Schiff protonée et transfert à l'aspartate 85, puis M* 412 qui, avec la recapture d'un proton donné par l'aspartate 96, se convertit lentement (5 msec) en O640 avec le rétinol désormais dans la conformation tout-*trans*, puis en bR560, l'état initial avec la conformation dite « de repos ». L'état M* joue le rôle critique d'intermédiaire entre la libération du proton et sa recapture. Il pourrait exister sous deux formes : M1 avec la base de Schiff accessible de l'extérieur et M2 avec celle-ci accessible du cytoplasme. La bactériorhodopsine joue donc le rôle de pompe à proton photo-énergisée sans que soit exclue une fonction *photo*-sensorielle.

Oesterhelt et Stoerkenius ont observé, pour la première fois en 1971 par microscopie électronique et diffraction des rayons X, une organisation cristalline spontanée en réseau plan hexagonal de la rhodopsine dans les membranes pourpres, au sein de la double couche lipidique, avec une cellule unitaire de 3 molécules de bactériorhodopsine pour environ 40 molécules de lipides. La résolution de la structure tridimensionnelle de la molécule de rhodopsine a été obtenue par Henderson et ses collaborateurs à l'aide d'une nouvelle méthode de microscopie électronique avec faibles doses d'électrons dans un milieu sous vide où l'environnement aqueux naturel a été remplacé par une solution de glucose non volatile. L'analyse par transformée de Fourier des images de microscopie (bandes parallèles défocalisées sur fond clair) donne les phases et celle des images de diffraction (distribution de taches discrètes) fournit les amplitudes. Les « cartes de contour » obtenues initialement en 1975 à une résolution de 7Å s'accordent avec un modèle de repliement de la chaîne polypeptidique sous la forme d'un « serpent » avec 7 hélices transmembranaires. La séquence en acides ami-

nés déterminée chimiquement par Ovchinnikov et coll. (1979) va dans le même sens : sur 277 acides aminés, 66 % sont hydrophobes et regroupés, précisément, en 7 segments d'environ 20-28 acides aminés susceptibles de former des hélices α . L'analyse par les mêmes auteurs des points de clivage par des enzymes protéolytiques a même permis d'orienter l'acide aminé NH_2 terminal vers l'extérieur de la cellule et l'acide aminé COOH terminal vers le cytoplasme.

Des améliorations successives de la technique permettent aujourd'hui d'atteindre une résolution 3.5 Å (qui est celle de l'acide aminé individuel) et d'obtenir un accord satisfaisant avec les modèles atomiques. Les 7 hélices transmembranaires composent un « faisceau » organisé en sens inverse des aiguilles d'une montre (vu de la surface extracellulaire) avec une poche centrale où se lie le rétinol (avec la participation des 7 hélices α et la contribution de 21 acides aminés) et un canal axial pour les protons (avec la participation de 5 hélices α et la contribution de 26 acides aminés). Le rétinol se trouve à mi-chemin entre faces cytoplasmiques et extracellulaires avec un angle de $20^\circ (\pm 10^\circ)$ par rapport au plan de la membrane. La mutagenèse dirigée, en accord avec les données structurales, singularise la lysine 216 (hélice G ou VII) qui établit une base de Schiff avec le rétinol ainsi que l'aspartate 85 (hélice C ou III) comme donneur et l'aspartate 96 (hélice C) comme accepteur de protons.

Enfin, Subramanian et coll. (1993) ont obtenu les premières données structurales sur le changement conformationnel qui intervient dans le cycle de photoactivation à l'aide d'un appareil de « trempe » ultrarapide de l'échantillon qui passe devant un flash de Xénon de 20 msec avant de plonger dans l'éthane liquide. Le changement le plus important porte sur le pic produit par l'hélice F (n° VI) qui se déplacerait du centre vers l'extérieur de la molécule ainsi que par le pic correspondant à l'hélice G (n° VII) qui effectuerait un mouvement de glissement entraînant une rotation du rétinol d'environ 3° supplémentaire. Le changement conformationnel affecterait principalement la partie la plus cytoplasmique de la molécule, celle qui chez les récepteurs à 7 hélices transmembranaires intervient dans l'interaction avec la protéine G. Il s'agit, bien entendu, d'une transition allostérique dans le sens premier du terme, puisque la distance entre rétinol et face cytoplasmique est de l'ordre de 12 Å.

La rhodopsine des vertébrés constitue 90 % des protéines des cônes de la rétine ; elle se compose d'une seule chaîne de 348 acides aminés, dont 50 % est intégré à la phase membranaire et le reste réparti également entre face cytoplasmique et milieu intradiscal. Dans la cellule rétinienne à l'obscurité, le canal Na^+ présent dans la membrane plasmique se trouve dans un *état ouvert* (état dépolarisé) du fait de la liaison du GMP cyclique sur sa face cytoplasmique. La photoactivation de la rhodopsine, présente dans les disques intracytoplasmiques, entraîne une activation « allostérique » de la protéine G hétérotrimérique ($\alpha \beta \gamma$) (ou transducine) spécifique de la rhodopsine. A l'obscurité, la transducine est associée à la rhodopsine et forme un complexe stable avec le GDP. La photo-

activation de la rhodopsine entraîne un échange entre GDP et GTP au niveau d'un site présent sur la sous-unité a qui se dissocie du complexe et va se lier à la phosphodiesterase du GMP cyclique qui s'active. L'activation de la phosphodiesterase fait chuter le niveau intracellulaire de GMP cyclique qui entraîne la *fermeture* du canal Na⁺, la membrane plasmique s'hyperpolarise. A la différence de la bactériorhodopsine, la photoactivation résulte de l'isomérisation du rétinol de la conformation 11 *cis* à *tout-trans* avec une cascade de multiple photo intermédiaires (photo-, batho-, lumi-, méta-rhodopsin I et II, opsine + rétinol tout-trans). La métarhodopsine II R*, qui a perdu un proton par rapport à la métarhodopsine I, déclenche l'activation de la transducine. L'analogie avec la bactériorhodopsine dans la distribution des acides aminés hydrophiles/hydrophobes suggère également un modèle à 7 hélices transmembranaires, avec l'acide aminé NH₂-terminal exposé au milieu intradiscal et l'acide aminé COOH-terminal à la face cytoplasmique. La base de Schiff s'établit également entre le rétinol et une lysine de l'hélice G (Lys 296), l'autre point d'attachement étant le glutamate 113 (de l'hélice C). D'autre part sur l'hélice F, le tryptophane 265 et la tyrosine 268 jouent un rôle critique dans la photoactivation, les acides aminés aux positions 261 et 269 de la même hélice intervenant dans la « couleur » du pigment des cônes, de concert avec les acides aminés à la position 293 de l'hélice G : pigment vert (F 293, F 261, A269), pigment rouge (Y293, Y261, T269). L'observation par microscopie électronique de cristaux bidimensionnels de rhodopsine bovine confirme une organisation transmembranaire avec 7 hélices transmembranaires orientées essentiellement de manière perpendiculaire au plan de la membrane, mais moins allongée et plus élargie que la bactériorhodopsine. L'analyse très approfondie par mutagenèse dirigée réalisée par Khorana et collaborateurs démontre, entre autres choses, que les boucles cytoplasmiques C-D et E-F sont requises pour la *liaison* et la *transduction* de la transducine.

Les récepteurs de neuromédiateurs et d'hormones liés aux protéines G composent une immense famille de protéines homologues à 7 hélices transmembranaires dont le chef de file est le récepteur β₂-adrénergique dont l'ADN fut cloné par Lefkowitz et collaborateurs en 1986 (soit environ 4 ans après le récepteur de l'acétylcholine). D'une manière générale, toutes ces molécules présentent un profil d'hydrophobie similaire à celui de la rhodopsine, avec 7 segments hydrophobes d'environ 20-25 acides aminés et des identités de séquence très significatives pour les prolines et les acides aminés aromatiques (acides aminés canoniques) en dépit du fait que le pourcentage moyen d'homologie est relativement bas (12-18 %). Les parties les plus conservées se trouvent au niveau des hélices transmembranaires et dans certaines régions cytoplasmiques (interaction avec protéine G).

Marquage d'affinité et mutagenèse dirigée permettent d'identifier des acides aminés qui contribuent aux sites actifs qui lient neuromédiateurs et hormones. Dans le cas du récepteur β₂-adrénergique, la plupart des hélices participent à la formation de la poche où se loge le neuromédiateur, avec une contribution pri-

vilégiée des hélices II et VII, d'autres hélices et d'autres acides aminés intervenant différemment dans l'action des agonistes et des antagonistes. Le modèle de Hibert et coll. (1991) pour les sites de liaison de l'acétylcholine, de la norépinéphrine, de la sérotonine et de la dopamine fait jouer un rôle privilégié à : 1) l'Asp 3 (11) lorsqu'il y a formation d'une paire ionique (+-) entre ligand et récepteur ; 2) un groupe de 3 acides aminés aromatique Tyr 6 (13), Phe 6 (16) et Trp 3 (04) qui s'organisent en corbeille aromatique et joueraient un rôle dans l'activation ; 3) une sérine 5 (04 ou 07) qui formerait un lien hydrogène avec le groupe hydroxyle du noyau catéchol et participerait à la « spécificité » de reconnaissance du ligand. Ce modèle reste encore très spéculatif. Dans le cas des récepteurs de peptides, leurs sites de liaison font intervenir boucles et acides aminés extracellulaires. Il est remarquable que dans le cas du récepteur de la substance P, des sites d'agents pharmacologiques inhibiteurs non peptidiques ou métalliques (Zn^{++}) ont été identifiés dans des domaines distincts du site de liaison du neuropeptide qui peuvent, en toute légitimité, être qualifiés d'allostériques. Enfin, les récepteurs du glutamate liés à des protéines G (ou « métabotropiques ») utilisent eux aussi des séquences homologues (à 22,3 %) d'une protéine bactérienne, la « Leucine-isoleucine-valine — binding protein » (LIVBP) pour former le site de liaison du glutamate dans leur domaine N-terminal. Les domaines d'interaction avec les protéines G ont été identifiés, comme dans le cas de la rhodopsine, principalement à la boucle 3 (située entre les hélices V et VI) sur la face cytoplasmique. La construction de chimères entre récepteurs muscariniques et β -adrénergiques montre que cette boucle 3, à elle seule, suffit pour conférer la spécificité de liaison de la protéine G correspondante. Il existe même un récepteur, celui du PACAP, qui exploite cette propriété et présente spontanément un épissage alternatif au niveau de la boucle 3, qui lui donne la possibilité d'effectuer une transduction du signal différente dans des tissus différents.

Le modèle concerté de transition allostérique de Monod-Wyman-Changeux (1965) s'applique aux récepteurs-canaux en dépit d'une organisation moléculaire hétéro-oligomérique, et donc seulement *quasi*-symétrique, moyennant la prise en compte d'une cascade de transitions conformationnelles $B \rightarrow A \rightarrow I \rightarrow D$ entre état actif et désensibilisés. Le cas des récepteurs à 7 hélices transmembranaires paraît moins évident, sauf si l'on considère le récepteur monocaténaire lui-même comme un « oligomère » covalent de 7 sous-unités α hélicales ou bien si celui-ci s'associe avec lui-même, dans la membrane, en oligomère « labile » (pour l'instant non identifiée). La découverte par Cotecchia et coll. (1990) de mutants du récepteur $\alpha 1$ adrénergique au phénotype très singulier rend cependant l'extension du modèle allostérique aux récepteurs à 7 hélices plausible. Ces mutants, qui ont été retrouvés avec plusieurs autres récepteurs, et à la fois à des niveaux différents dans la séquence du récepteur, présentent plusieurs propriétés nouvelles : 1) activité transductrice constitutive en l'absence d'agoniste ; 2) augmentation d'affinité apparente pour les agonistes et pas pour les antagonistes ; 3) augmen-

tation d'amplitude de la réponse pour les agonistes et de l'« activité intrinsèque » pour les agonistes partiels. De telles mutations pourraient rendre compte de pathologies héréditaires telles que la *retinitis pigmentosa* (rhodopsine), la puberté précoce familiale masculine (récepteur de l'hormone lutéinisante (LH)), adénomes hyperfonctionnels de la thyroïde (récepteur de la thyrotropine)... L'interprétation dans le cadre du modèle allostérique suppose l'existence de plusieurs états conformationnels R, R*, R*G au lieu des R et RG du modèle classique ainsi que l'interconversion spontanée, en l'absence de ligand, de R en R*. Les ligands pharmacologiques stabiliseraient sélectivement R et/ou R* et les mutations « constitutives » entraîneraient spontanément le récepteur dans l'état R*, en agissant de manière privilégiée sur la constante d'isomérisation $R \rightarrow R^*$.

Rhodopsine et récepteurs à 7 hélices transmembranaires sont sujets à désensibilisation, mais, à la différence de l'exemple bien étudié des récepteurs canaux, ce terme regroupe plusieurs processus : transitions conformationnelles réversibles, phosphorylations, changements du nombre de récepteurs disponibles pour l'activation et dont la récupération exige (ou non) une synthèse protéique... Le mécanisme le plus couramment accepté pour la « désensibilisation conformationnelle » de la réponse fait intervenir, dans le cas de la rhodopsine, les étapes suivantes : phosphorylation multiple du domaine cytoplasmique COOH terminal (acides aminés 334-343) qui entraîne la dissociation du rétinol et de l'opsine, réduit la capacité à lier la transducine et augmente celle à lier l'*arrestine* (protéine soluble qui bloque l'activation de la cascade déclenchée par la phosphodiesterase). Le « recyclage » inclut la réassociation avec le rétinol, la libération de l'*arrestine* et la déphosphorylation de l'opsine. Un schéma semblable a été proposé pour le récepteur β -adrénergique par le groupe de Lefkowitz avec l'identification d'une kinase spécifique : la « β -adrenergic receptor kinase » ou β ARK, et d'une protéine homologue de l'*arrestine* : la β -*arrestine*. Enfin, des désensibilisations homologues et hétérologues, entre récepteurs liés à des protéines G, comme entre ce type de récepteur et les récepteurs-canaux ont été mis en évidence. On dispose désormais d'éléments suffisants pour envisager l'analyse des mécanismes moléculaires de l'apprentissage.

La dépendance aux drogues psychotropes constitue un premier modèle très rudimentaire d'apprentissage puisque l'exposition prolongée à ces agents pharmacologiques entraîne des modifications de longue durée de la chimie du cerveau. D'une manière générale, ces agents chimiques peuvent être compris comme des analogues structuraux des neuromédiateurs endogènes qui, soit se fixent sur les mêmes récepteurs et y agissent comme agoniste (ou antagoniste), soit stimulent (ou bloquent) la libération de ces neuromédiateurs. La nicotine, les benzodiazépines, les barbiturates, l'alcool... agissent sur les récepteurs canaux spécifiques de l'acétylcholine, du GABA ou du glutamate. La morphine, le Δ tétrahydro-cannabinol, le LSD, la mescaline affectent des récepteurs liés à des protéines G spécifiques des opiacés (leu/met/enképhalines, β -endorphine), des cannabinoïdes (anandamide), de la sérotonine ou de la norépinéphrine. La

cocaïne bloque la récapture de catécholamine tandis que les amphétamines stimulent leur libération. La sensation de « plaisir » liée à la prise de drogue et la dépendance qui en résulte s'interprètent sur la base des anciennes expériences d'auto-stimulation de Olds et Milner (1954). Les points d'autostimulation se répartissent sur une carte intracérébrale qui coïncide globalement avec les neurones dopaminergiques du système « méso-corticolimbique ». Les divers agents pharmacologiques qui entraînent la dépendance entrent dans des boucles d'auto-stimulation chimique au niveau de ce système en agissant sur des récepteurs de neuromédiateur appartenant à, ou en relation étroite, avec ces neurones.

Au niveau du *locus coeruleus* dont les neurones noradrénergiques stimulent, en particulier, l'activité des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, l'effet aigu des opiacés consiste en une inhibition de l'activité neuronale. Le mécanisme plausible de cette inhibition est une activation par la morphine du récepteur (μ) des opiacés qui, par le truchement de protéines G ($G_{i\alpha}$ et $G_{o\alpha}$), vont interagir directement, soit avec un canal K^+ , et en l'ouvrant, créer une hyperpolarisation, soit avec l'adénylate cyclase, et en l'inactivant diminuer la phosphorylation d'un canal Na^+ , ainsi que son activité et, de ce fait, agir également dans le sens d'une hyperpolarisation. Dans tous les cas, l'hyperpolarisation provoquée par la morphine entraîne une diminution de l'activité électrique spontanée et chronique du neurone. A plus long terme, l'activité spontanée reprend en présence de morphine, une « tolérance » se développe. Par contre, l'arrêt brutal de l'exposition entraîne une hyperactivité prononcée, elle-même manifestation d'un syndrome d'abstinence ou de « sevrage » entraînant la reprise de drogue, et donc la dépendance aux opiacés. Ces manifestations à long terme correspondent, semble-t-il, à une adaptation chronique de la voie de l'AMP cyclique dont les divers composants présentent un niveau de base élevé. Cette « homéostasie de compensation » fait intervenir, en toute vraisemblance, la désensibilisation des récepteurs des opiacés, diverses phosphorylations et régulations d'activités géniques en cours d'identification.

La potentialisation à long terme (ou LTP) découverte en 1973 par Bliss et Lømo est très étudiée depuis comme modèle élémentaire de mémoire. On sait que l'hippocampe intervient chez l'Homme dans les processus de mémorisation et en particulier dans le transfert de mémoires à court terme dans le compartiment de mémoire à long terme (Milner). Dans le but de mettre en évidence des processus synaptiques qui participent à la mise en place de traces de mémoire dans l'hippocampe, une stimulation conditionnante de la voie perforante à 10-15 HZ pendant plusieurs secondes est réalisée chez le lapin anesthésié et l'enregistrement des réponses effectué au niveau des cellules pyramidales de l'aire dentelée. On observe une augmentation de l'amplitude de la population de potentiels synaptiques et de la population d'impulsions ainsi qu'une réduction de la latence de la population d'impulsions. Ces potentialisations peuvent atteindre une ampleur de 200 % par rapport au contrôle. Collingridge et coll. (1983) ont utilisé une préparation de tranche d'hippocampe en survie pour, d'abord, repro-

duire « *in vitro* » la LTP et, ensuite, étudier l'effet d'agents pharmacologiques variés sur ce processus. Ils ont montré que les synapses « modifiées » utilisaient le glutamate comme neuromédiateur et le récepteur AMPA, comme récepteur postsynaptique. Ils ont également découvert qu'un inhibiteur du récepteur NMDA, l'APV bloque la LTP sans inhiber la transmission synaptique. L'activation du récepteur NMDA paraît nécessaire à la potentialisation sans que celui-ci intervienne dans la transmission synaptique. *In vivo*, chez le rat, l'APV ralentit la cinétique d'acquisition de la mémoire spatiale, mesurée avec le labyrinthe aquatique de Morris. Dans les mêmes conditions, l'APV diminue la LTP, mais une relation *causale* entre LTP et apprentissage *in vivo* n'est pas encore établie de manière rigoureuse.

La contribution du récepteur NMDA à la potentialisation à long terme se trouve éclairée par l'observation de Nowak et coll. (1984) suivant laquelle le Mg^{++} bloque le canal du récepteur NMDA de manière voltage-dépendante et prévient, de ce fait, l'entrée de Ca^{++} dans la cellule. Ainsi, la dépolarisation de la membrane post-synaptique résultant de l'activation des récepteurs AMPA consécutive à la tétanisation, libèrerait le Mg^{++} du canal du récepteur NMDA et laisserait, de ce fait, entrer les ions Ca^{++} dans la cellule qui, eux-mêmes, entraîneraient le changement d'efficacité synaptique. Celui-ci pourrait porter tant sur l'amplitude de la réponse postsynaptique de type AMPA, que sur la quantité de neuromédiateur libéré par la terminaison du fait d'une signalisation « rétrograde » sur la cellule postsynaptique. Dans ces conditions, le récepteur postsynaptique NMDA jouerait le rôle de lecteur de coïncidence. D'autre part, le récepteur métabotrope du glutamate contribuerait aux effets postsynaptiques ainsi qu'une cascade de seconds messagers. NO et l'acide arachidonique ont été proposés comme signaux rétrogrades, sans beaucoup de preuves convaincantes à l'appui. De nombreuses inactivations géniques altèrent la LTP sans que l'on puisse tirer beaucoup d'informations de ces résultats trop peu spécifiques dans la compréhension du processus de potentialisation à long terme.

J.-P. C

SÉMINAIRES

Ethique et cognition

- 20 mars, P. RICŒUR : Ethique, morale et sagesse pratique.
- 27 mars, B. DUBOIS : Lobe frontal et régulation des comportements et des conduites sociales.
- 3 avril, M. CANTO-SPERBER : Le cognitivisme moral.

- 10 avril : J. BLAIR : Cognitive developmental approach to morality.
- 15 mai, H. KUMMER : Règles de conduite dans les sociétés de primates (babouins, chimpanzés).
- 22 mai, L. BONATTI : Fondements naturels des Droits de l'Homme.
- 29 mai, D. SPERBER : Ethique et cultures.
- 12 juin, D. PREMACK : Moral primitives.
- 19 juin, H. ATLAN : Le plaisir, la douleur et les niveaux de l'éthique.

B. COMPTE RENDU DE L'ACTIVITÉ DE LABORATOIRE
DE COMMUNICATIONS CELLULAIRES

I. ORGANISATION FONCTIONNELLE DES RÉCEPTEURS
NICOTINIQUES PÉRIPHÉRIQUES ET CENTRAUX

1. *Un mécanisme cinétique pour le récepteur nicotinique fondé sur une cascade de transitions entre états allostériques multiples* (CHANGEUX ET EDELSTEIN, 1994 ; EDELSTEIN et coll., 1995, à paraître).

Les progrès spectaculaires des connaissances sur la structure du récepteur de l'acétylcholine et sur la dynamique de ses transitions conformationnelles justifient un réexamen attentif de la proposition initiale (Changeux et coll., 1967 ; Changeux, 1969) que le récepteur est une protéine allostérique membranaire spécialisée dans la communication intercellulaire. En accord avec le modèle de Monod, Wyman et Changeux (1965), le récepteur est un oligomère, mais il possède une structure hétéropentamérique avec un axe de symétrie de pseudo-rotation, perpendiculaire au plan de la membrane et qui coïncide avec le canal ionique que bordent les segments transmembranaires M2 de chaque sous-unité. La protéine réceptrice porte deux sites pour le neuromédiateur, mais seulement partiellement identiques. Enfin, en plus des deux états discrets, fermé (B) et ouvert (A), qui se trouvent engagés dans la transition d'activation, le récepteur est sujet à une cascade de transitions conformationnelles vers des états fermés « désensibilisés » I et D, d'affinité élevée pour les ligands nicotiniques. Fait important, toujours en accord avec le modèle allostérique, ces transitions ont lieu spontanément en l'absence de ligand (M. Jackson, 1994 ; Changeux et Edelstein, 1994).

Cette année, la mise en relation de la liaison de ligands avec les cinétiques d'interconversion entre états multiples a été modélisée sur la base d'états de transition stabilisés par les divers ligands et dont la position sur une hypothétique coordonnée de réaction détermine les vitesses de transition d'un état à l'autre (Edelstein et coll., 1995). Le modèle formel prédit un nombre de propriétés critiques toutes susceptibles de test expérimental : 1) les conditions de l'acti-

vation $R \rightarrow A$ requièrent que l'affinité de A pour l'acétylcholine soit 140 fois supérieure aux valeurs initialement estimées ; 2) la coopérativité de la courbe dose-réponse n'exige pas que la liaison de deux molécules d'acétylcholine soit nécessaire à l'ouverture du canal ; 3) le retour de l'état désensibilisé à l'état de repos ne s'effectue pas nécessairement par une voie différente de la chaîne de transitions aller : $R \rightarrow A \rightarrow I \rightarrow D$; 4) le modèle rend compte de l'effet de mutations du type $\alpha 7$ L247T, supposées ouvrir le canal dans l'état désensibilisé ainsi que de beaucoup d'autres propriétés du récepteur.

2. *Localisation du site actif du récepteur nicotinique à l'interface entre sous-unités* (Coll. D. et S. BERTRAND, Centre Médical Universitaire, Genève) (CORRINGER et coll., 1995).

Les expériences de marquage des deux sites actifs du récepteur de Torpille avec la toxine α , le DDF ou le curare, révèlent un marquage significatif des sous-unités γ et δ , en complément du marquage principal de la sous-unité α . La localisation des sites aux interfaces entre sous-unités [$\alpha \gamma$] et [$\alpha \delta$] rend compte des résultats de marquage et des différences de propriété pharmacologique des deux sites. Dans le but d'identifier les acides aminés qui participent au composant non- α , ou « complémentaire », du site actif, le tryptophane W55 de la sous-unité neuronale $\alpha 7$, homologue des tryptophanes 55 et 57 marqués par la d-tubocurarine sur les sous-unités γ et δ de Torpille, a été muté sur la chimère homooligomérique [$\alpha 7V201 - 5HT3$] (avec laquelle des expériences de liaison et d'électrophysiologie peuvent être menées en parallèle). Le remplacement de W55 par une phénylalanine, une alanine et une histidine entraîne une diminution progressive de l'affinité de liaison et de la réponse électrophysiologique pour l'acétylcholine, la nicotine et la dihydro- β -érythroïdine. Des effets comparativement plus faibles sont observés après mutation des acides aminés voisins dans la région 53-59, sauf avec la glutamine Q57 qui contribue donc, avec W55, à la partie « complémentaire » du site actif.

3. *Evolution moléculaire des gènes de la famille du récepteur nicotinique* (N. LE NOVÈRE et J.P. CHANGEUX, 1994).

L'analyse phylogénétique des gènes codant pour les divers membres de la famille des récepteurs nicotiniques a été effectuée par les méthodes cladistiques (maximum de parcimonie) et phénétiques (regroupement par voisinage) d'analyse de séquences et sur la base de la structure des gènes chromosomiques. Les résultats sont compatibles avec une première duplication génique à partir d'un gène ancestral commun avant l'apparition des *Bilateria*. Puis, trois sous-familles se sont formées : sous-famille I, celle des sous-unités neuronales ($\alpha 7$, $\alpha 8$) qui lient l' α -bungarotoxine ; sous-famille III, des sous-unités neuronales ($\alpha 7$ - $\alpha 6$, $\beta 2$ - $\beta 4$) qui contiennent également la sous-unité musculaire $\alpha 1$ (qui porte le site actif) et

sous-famille IV des sous-unités musculaires non- α ($\beta 1$, γ , δ , ϵ). La sous-famille II des sous-unités nicotiniques d'insectes pourrait être orthologue aux sous-familles III et IV. Plusieurs commutations d'expression tissulaire, de neuronal à musculaire et réciproquement, se sont produites au cours de l'évolution.

La diversification de la sous-famille III commence avec les ancêtres des cordés (800-600 millions d'années) et se poursuit avec les duplications $\alpha 3/\alpha 6$ (529 millions d'années) et $\beta 2/\beta 4$ (425 millions d'années), un peu avant et un peu après la divergence des tétrapodes à partir des téléostéens. Cette diversification accompagne la complexification du cerveau et tout particulièrement du système cholinergique.

4. *Analyse in vivo et in vitro des séquences promotrices et régulatrices du gène chromosomique de la sous-unité neuronale $\beta 2$* (BESSIS et coll., 1995, sous presse ; ZOLI et coll., 1995).

La sous-unité $\beta 2$ est, de toutes les sous-unités neuronales connues, celle dont la distribution d'expression est la plus large dans le système nerveux central (Zoli et coll., 1995) et dont l'apparition des transcrits, très précoce, coïncide avec la différenciation des neurones (Zoli et coll., 1995). Des expériences de transgénèse chez la souris (Bessis et coll., 1995) montrent qu'un segment flanquant de 1 163 pb situé en amont du code initiateur ATG et fusionné au gène de la β -galactosidase suffit pour déterminer l'expression neurone-spécifique du gène rapporteur ainsi que son expression dans le système nerveux périphérique, dans la moelle épinière et dans plusieurs régions du télencéphale (noyaux gris centraux, thalamus, hypothalamus...) avec, toutefois, quelques expressions ectopiques.

Des expériences de transfection transitoire confirment que cette longueur de promoteur suffit pour assurer un haut niveau de transcription du gène de la luciférase dans deux lignées de neuroblastome (NIE115, SK-N-BE) et dans le phéochromocytome PC12, mais pas dans la lignée striatale SVLT, les fibroblastes Hela et la lignée de cellules rénales 293. L'analyse par délétions et par mutations ponctuelles révèle plusieurs éléments *silenceurs*, l'un situé dans la région 5' distale (entre -1.2 et -1.0 Kbp) est actif sur les fibroblastes et sur les neuroblastomes, un autre (entre -862 et -283 bp) est efficace sur les neuroblastomes, mais pas sur les fibroblastes, enfin l'élément NRSE/RE1 situé à l'extrémité 3' du promoteur joue un rôle de silenceur très efficace dans les lignées neuronales et non neuronales. Un élément *activateur* important (entre -245 et -95bp) contient un site de liaison SP1 et une boîte E, dont la mutation réduit efficacement la transcription. Une double régulation entre multiples éléments activateurs et éléments silenceurs se retrouve également avec d'autres promoteurs de gènes d'expression neuronale.

II. RÔLE DES RÉCEPTEURS NICOTINIQUES CENTRAUX SUR LES COMPORTEMENTS D'APPRENTISSAGE

1. *L'inactivation du gène de la sous-unité neuronale β_2 par recombinaison homologue chez la souris élimine la liaison de haute affinité de la nicotine dans le cerveau et altère certains tests d'apprentissage par évitement* (Coll. Unité d'embryologie moléculaire, Institut Pasteur) (PICCIOTTO et coll. 1995).

L'inactivation *in vivo* du gène β_2 par recombinaison homologue chez la souris entraîne, chez les souris homozygotes, une perte de l'ARNm révélé par hybridation *in situ*, sans altération significative de l'expression des ARNm codant pour les sous-unités α_4 , α_5 , β_3 , β_4 . La liaison de haute affinité de la nicotine disparaît complètement chez les souris homozygotes et se trouve diminuée de 50 % chez les hétérozygotes. Les enregistrements électrophysiologiques de neurones thalamiques sur tranches de cerveau montrent que la réponse aux agonistes nicotiques : nicotine >DMPP>cytisine, présente chez les souris sauvages, disparaît complètement chez les souris mutantes homozygotes β_2^-/β_2^- , alors que cette réponse persiste dans l'habénula, mais avec une pharmacologie différente (cytisine = nicotine > DMPP) qui correspond au récepteur $[\alpha_3 \beta_4]$. Les souris homozygotes ne diffèrent pas des souris sauvages par le rythme cardiaque, la température du corps ou l'activité locomotrice. Les souris mutantes passent l'épreuve d'apprentissage de Morris sans difficulté mais présentent des différences lorsqu'on les teste pour la rétention d'une réponse inhibitrice d'évitement. Suivant ce test, la souris est placée dans une chambre éclairée dans laquelle elle reste un certain temps appelé « temps de latence » (que l'on mesure) avant de fuir spontanément dans un compartiment obscur où elle reçoit un choc électrique. Le temps de latence est mesuré à nouveau 24 heures après. On trouve que ce temps est prolongé chez les souris qui ont mémorisé le choc électrique. La nicotine injectée à très faible concentration (10 mg/kg) immédiatement après le premier choc électrique, augmente la latence et donc favorise la rétention. Chez la souris mutante homozygote, la nicotine n'a plus d'effet sur la rétention. D'autre part, en l'absence de traitement par la nicotine, la durée du temps de latence est spontanément augmentée chez les souris mutantes. Cet accroissement de performances chez la souris mutante n'est pas expliqué.

2. *Rôles du cortex préfrontal et des récepteurs nicotiques et muscariniques sur les fonctions cognitives chez le rat* (Coll. Laboratoire des Neurosciences Cognitives, CNRS, Marseille) (GRANON et coll., 1995a, 1995b).

Dans un premier temps, l'effet de lésions de l'aire prélimbique du cortex préfrontal chez le rat adulte a été étudié sur l'acquisition et la rétention des tâches avec délais d'alternance spatiale (« non-matching-to-sample » ou NMTS) et d'appariement à l'échantillon (« matching-to-sample » ou MTS).

Les deux tâches engagent l'une et l'autre la mémoire de référence et la mémoire de travail, mais la lésion n'altère que la mémoire de travail. La comparaison des deux tâches révèle des déficits similaires lorsque les rats ont été entraînés *après* l'opération ; par contre, chez les rats entraînés *avant* l'opération, le déficit est plus marqué dans la tâche MTS que NMTS. La tendance aux persévérations s'observe exclusivement avec la tâche MTS. Ces résultats suggèrent que les lésions préfrontales entraînent des déficits de la mémoire de travail consécutif à l'altération de l'encodage temporel, une susceptibilité accrue à l'interférence et un déficit dans le traitement de l'information demandant un effort, comme celui engagé dans les mécanismes de sélection de réponse.

Dans un second temps, la contribution des divers types de récepteurs cholinergiques présents dans le cortex préfrontal a été étudié en mesurant les effets respectifs d'antagonistes nicotiques (bungarotoxine neuronale, dihydro- β -erythroïdine) et muscarinique (scopolamine) injectés dans l'aire prélimbique du cortex préfrontal. La bungarotoxine neuronale entraîne une diminution significative des performances de la mémoire de travail mesurée par la tâche de réponse d'appariement à l'échantillon (MTS) mais est sans effet sur la tâche d'alternance spatiale (NMTS). Au contraire, la scopolamine altère la mémoire de travail de manière semblable dans les deux tâches. Les deux types d'antagonistes cholinergiques utilisés sont sans effet sur la mémoire de référence. La transmission nicotinique semble donc importante dans les tâches qui requièrent un effort dans le traitement de l'information, alors que le système muscarinique est impliqué dans les processus généraux de mémoire de travail.

III. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES SYNAPTIQUES DU MUSCLE ET SYNAPTOGÉNÈSE DANS LE CORTEX DE MACAQUE

1. *Régulation d'expression et épissage de l'ARNm codant pour l'acétylcholinestérase dans le muscle* (Coll. Laboratoire de Neurobiologie de l'ENS, Paris) (LEGAY et coll. 1995).

Un gène unique code pour les diverses sous-unités catalytiques de l'acétylcholinestérase par épissage alternatif d'exons codant pour les peptides C-terminaux. Les *sous-unités avec une queue*, désignées par le sigle T (*Tailed*) incluent des formes avec une queue collagénique ou une queue hydrophobe. Les sous-unités *hydrophobes* H produisent des dimères membranaires. R désigne une forme appelée *Read through* déduite de la séquence du gène et qui n'a pas encore été identifiée. L'analyse par PCR et par hybridation *in situ* du développement des diverses formes d'épissage de l'ARNm révèle, chez l'adulte, uniquement les transcrits T. Ceux-ci sont localisés exclusivement au niveau des jonctions neuromusculaires alors que, dans le muscle embryonnaire, et jusqu'à la naissance, le diaphragme contient les 3 types d'ARNm T, R et H. Dès E13, l'ARNm de la forme T s'accumule préférentiellement sur la ligne médiane où les premiers contacts neuromusculaires s'établissent.

2. *Implication de la protéine 54K « apparentée à la lamine », dans l'association des filaments intermédiaires avec la membrane post-synaptique de l'électrocyte de Torpedo marmorata* (Coll. Laboratoire de Biologie cellulaire des membranes, Institut Jacques Monod, Paris) (CARTAUD et coll., 1995, sous presse).

Le rôle de la protéine 54K, identifiée initialement au niveau de la membrane postsynaptique de l'électrocyte de Torpille avec des anticorps anti-lamine B (Cartaud et coll., 1989), est étudié à l'aide d'un test de liaison *in vitro* et par immunofluorescence. *In vitro*, la protéine 54K lie, à des concentrations micromolaires la desmine, une protéine constitutive des filaments intermédiaires de Type III. D'autre part, des fragments de membrane riches en récepteur, incubés *in vitro* en présence de desmine, entraînent la formation de filaments de desmine et cette « reconstitution » est bloquée par des anticorps anti-54K et par extraction des membranes à pH11. Des expériences d'immunofluorescence avec l'électroplaque de Torpille en développement montrent que la protéine 54K s'associe aux agrégats de récepteur à un stade précoce du développement de l'électrocyte et que, de manière concomitante, un réseau polarisé de desmine se forme à partir de la membrane postsynaptique. La protéine 54K est donc engagée dans l'organisation du réseau sous-neural des filaments intermédiaires.

3. *Synaptogénèse dans le cortex préfrontal du singe macaque* (Coll. Department of Neurobiology, Yale University) (BOURGEAIS et coll., 1994).

Depuis le début du siècle avec Fleschig, l'idée est couramment admise que le cortex préfrontal qui se trouve engagé dans les comportements cognitifs les plus évolués est la région du cortex cérébral dont le développement est le plus tardif. L'examen par microscopie électronique quantitative de la synaptogénèse dans le cortex préfrontal du macaque, du jour embryonnaire 47 jusqu'à 20 ans d'âge, montre que celle-ci ressemble, dans son développement temporel, à la synaptogénèse dans les aires sensorielles et motrices (Bourgeois et coll., 1994). On peut ainsi distinguer : 1) une *phase précorticale* (E47-E78) où les synapses sont trouvées seulement au-dessus et en dessous de la plaque corticale, mais pas dans celle-ci ; 2) une *phase corticale précoce* (E78-E104) pendant laquelle les synapses s'accumulent dans la plaque corticale, mais seulement au niveau des troncs dendritiques ; 3) une *phase rapide* qui suit et qui se termine deux mois après la naissance et culmine avec un maximum de 750 millions de synapses par mm³ ; 4) puis, l'enveloppe globale du nombre de synapses reste *stationnaire* de 2 mois à 3 ans avant de diminuer jusqu'à 20 ans. Il est intéressant de noter que la phase de surproduction synaptique et le plateau qui la suit coïncident avec les années d'apprentissage où l'expérience avec le monde extérieur laisse le plus de traces dans le système nerveux central.

IV. MODÈLES FORMELS DE MORPHOGENÈSE ET DE FONCTIONS COGNITIVES

1. Un modèle moléculaire de morphogénèse impliquant la lecture d'un gradient embryonnaire (KERSZBERG M. ET CHANGEUX J.P., 1994).

Un modèle précédemment formulé pour rendre compte de la compartimentation d'expression des gènes du récepteur nicotinique au niveau de la plaque motrice (Kerszberg et Changeux, 1993) est étendu au problème plus général de la morphogénèse du blastocyste embryonnaire de *Drosophile*. Le modèle se fonde sur la distribution spatiale initiale d'un gradient d'origine maternelle constitué par un facteur de transcription, appelé *morphogène M*. Celui-ci peut former des hétérodimères avec un autre facteur de transcription homologue, mais d'expression zygotique, appelé *vernier V*. M et V peuvent former tous les dimères possibles MM, MV, VV, qui diffèrent par leur translocation à travers la membrane nucléaire et par leur affinité respective pour des éléments présents dans le promoteur du gène codant pour V. De ce fait, ces divers dimères peuvent contribuer à l'activation, ou à l'inactivation de la transcription de V, rendant ainsi possible la formation d'éventuelles boucles d'*autorégulation*.

Le modèle prédit quatre régimes distincts, de complexité croissante : 1) MM active V, le gradient de M produit une frontière abrupte de transcription de V et un gradient secondaire de concentration de la protéine V ; 2) MV active V, une frontière abrupte de transcription et de distribution de la protéine V se développe ; 3) MM et MV entrent en compétition pour la liaison sur le promoteur de V : une bande stationnaire de transcription de V se forme ; 4) MM et VV sont en compétition, une bande de transcription de V se déplace d'une extrémité de l'embryon à l'autre, mais peut s'arrêter ou s'atténuer progressivement à une position intermédiaire. Le modèle rend compte simplement de la formation d'une frontière d'expression du gène *hunchback* à partir d'un gradient continu de protéine *bicoid*.

2. Modèles neuronaux de reconnaissance olfactive chez l'insecte (Coll. Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés, Bures-sur-Yvette et Laboratoire d'électronique de l'ESPCI, Paris) (KERSZBERG M. et MASSON C, 1995 et LINSTER et coll., 1995, sous presse).

La reconnaissance des odeurs est un sens très primitif qui se trouve particulièrement développé chez l'abeille *Apis mellifica*. Cette reconnaissance engage des cellules réceptrices de l'antenne qui se projettent sur les plusieurs milliers de neurones du lobe antennaire qui, eux-mêmes, s'organisent en 165 glomeruli dont la distribution d'activité dans l'espace et le temps participe à cette reconnaissance. Les glomérules présentent plusieurs régimes d'activité spontanée : 1) lorsque l'excitabilité synaptique est élevée, les glomérules sont le siège d'une

activité électrique oscillante, avec production stochastique d'impulsions ; 2) lorsque l'excitabilité est basse, des activités dites « de régime » s'établissent. Le modèle formel proposé rend compte de ces différents régimes et de leurs transitions réciproques ; il suggère, de plus, que la reconnaissance des odeurs requiert la répression des oscillations spontanées (en réglant le niveau d'excitabilité synaptique) au bénéfice d'un traitement différentiel des signaux olfactifs externes qui ré-activeraient différentiellement les oscillations présentes dans le premier mode (Kerszberg et Masson, 1995). Un modèle dérivé est appliqué à la détection d'un mélange de phéromones lors de la reconnaissance des partenaires sexuels chez le criquet (Linster et coll., 1995). Ces modèles pourraient s'appliquer à la discrimination des odeurs par le bulbe olfactif chez les vertébrés.

V. DÉTECTION ET ANALYSE DE MOLÉCULES D'ADN

1. *Alignement et détection de molécules d'ADN* (Coll. Laboratoire de physique statistique de l'Ecole Normale Supérieure, Paris) (BENSIMON, A. et coll., 1994 ; BENSIMON, D. et coll., 1995 ; WEIER et coll., sous presse).

Un procédé, qualifié de « peignage moléculaire », a été inventé pour observer au microscope des molécules individuelles d'ADN. Il consiste en : 1) l'attachement des molécules d'ADN par une extrémité libre (vraisemblablement 5' du fait de la présence d'un phosphate protoné) à une surface de verre recouverte d'une monocouche de sélane ; 2) l'extension et l'alignement des molécules par le déplacement d'un ménisque air-eau lors de l'évaporation de l'eau ; 3) le marquage par le colorant YOYO 1 de la molécule d'ADN et son observation par microscopie de fluorescence avec amplification vidéo. La longueur de la molécule d'ADN qui constitue le chromosome du bactériophage λ est estimée à $21,54 \pm 0,5$ μm contre $16,2$ μm sous forme non étendue. Un fragment de 106 bases du chromosome de colibacille a été étendu et des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 1 000 molécules) ont été détectées (Bensimon, A. et coll., 1994).

2. *Cartographie génétique par microscopie optique* (Coll. Center for Molecular Cyto Genetics, Berkeley and Molecular Cytometry, University of California, San Francisco).

L'analyse détaillée théorique et expérimentale du « peignage moléculaire » des molécules d'ADN, révèle que l'étirement de la molécule d'ADN dépend de manière critique des propriétés de la surface adhésive (Bensimon, D. et coll., 1995). L'extension linéaire de molécules individuelles d'ADN et leur hybridation *in situ* avec différentes sondes colorées, suivi de l'observation de leur alignement par microscopie de fluorescence (Weier et coll., 1995), permet une cartographie génétique directe, sans expérimentation *in vivo*.

PUBLICATIONS

1994 (fin)

Articles :

— Working memory, response selection and effortful processing in rats with medial, prefrontal lesions. S. GRANON, C. VIDAL, C. THINUS-BLANC, J.-P. CHANGEUX & B. POU CET. *Behav. Neurosci.* 108, 883-891.

— Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. A. BENSIMON, A. SIMON, A. CHIFFAUDEL, V. CROQUETTE, F. HESLOT & D. BENSIMON. *SCIENCE* 265, 2096-2098.

Revues :

— On allosteric mechanisms and acetylcholine receptors. J.P. CHANGEUX & S. EDELSTEIN. *Trends Biochem. Sci.* 19, 399-400.

— Ligand-gated ion channels as unconventional allosteric proteins. J.L. GALZI, & J.P. CHANGEUX. *Cur. Op. Struct. Biol.* 4, 554-565.

— Partners make patterns in morphogenesis. M. KERSZBERG & J.P. CHANGEUX. *Cur. Biol.* 4, 1046-1047.

— Synaptic development of the cerebral cortex : implications for learning, memory and mental illness. P. RAKIC, J.P. BOURGEOIS & P. GOLDMAN-RAKIC. *Prog. Brain Res.* 102, 227-243.

— Art and Neuroscience. J.P. CHANGEUX, LEONARDO, 27, 189-201.

— Coherent evolution of genome structure and DNA repair mechanisms : the control of mutation. M. KERSZBERG. *Proc. Royal Soc. Biol. Sci.* (sous presse).

1995

— ErbB3 and ErbB2/neu transduce the stimulatory effect of heregulin on acetylcholine receptor α -subunit gene expression in muscle : differential expression at the endplate. N. ALTIOK, J.L. BESSEREAU & J.P. CHANGEUX. *EMBO J.* 14, 4258-4266.

— Promoter elements conferring neuron specific expression of the β 2-subunit of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor studied *in vitro* and in transgenic mice. A. BESSIS, A.M. SALMON, M. ZOLI, N. LE NOVÈRE, M. PICCIOTTO & J.P. CHANGEUX. *Neuroscience*, 69, 807-819.

— Tempo of neurogenesis and synaptogenesis in the primate cingulate mesocortex : comparison with the neocortex : Comparison with the neocortex. B. GRANGER, F. TEKAIA, A.M. LE SOURD, P. RAKIC & J.P. BOURGEOIS. *J. Comp. Neurol.* 360, 363-376.

— Signal-induced selection among spontaneous oscillatory patterns in honey-bee olfactory glomeruli. M. KERSZBERG & C. MASSON. *Biol. Cybernetics* (sous presse).

— Direct involvement of a lamin-B-related (54kDa) protein in the association of intermediate filaments with the postsynaptic membrane of the *Torpedo marmorata* electrocyte. A. CARTAUD, B.J. JASMIN, J.P. CHANGEUX & J.J. CARTAUD. *J. Cell Sci.* 108 (sous presse).

— How neurons may compute : the case of insect sexual pheromone discrimination. C. LINSTER, M. KERSZBERG & C. MASSON. *J. Comput. Neurosci.* (sous presse).

— Developmental regulation of membrane traffic organization during synaptogenesis in mouse diaphragm muscle. C. ANTONY, M. HUCHET, J.P. CHANGEUX & J.J. CARTAUD. *J. Cell Biol.* 130, 959-968.

— Developmental regulation of acetylcholinesterase mRNA in the mouse diaphragm: alternative splicing and focalization. C. LEGAY, M. HUCHET, J. MASSOULIÉ & J.P. CHANGEUX. *Eurp. J. Neurosci.* 7, 1803-1809.

— The neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 2$ subunit gene promoter is activated by the Brn-3b POU family transcription factor and not by Brn-3a or Brn-3c. N.G.N. MILTON, A. BESSIS, J.P. CHANGEUX & D.S. LATCHMAN. *J. Biol. Chem.* 270, 15143-15147.

— Stretching and breaking DNA by a receding meniscus : Experiments and model. D. BENSIMON, A. SIMON, V. CROQUETTE & A. BENSIMON. *Phys. Rev. Lett.* 74, 4754-4757.

— Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex : differential roles in working memory, response selection, and effortful processing. S. GRANON, B. POU CET, C. THINUS-BLANC, J.P. CHANGEUX & C. VIDAL. *Psychopharmacology* 119, 139-144.

— Identification of a new component of the agonist binding site of the nicotinic $\alpha 7$ homooligomeric receptor. P.J. CORRINGER, J.L. GALZI, J.L. EISELÉ, S. BERTRAND, J.P. CHANGEUX & D. BERTRAND. *J. Biol. Chem.* 270, 11749-11752.

— A single (-) nicotine injection causes change with a time delay in the affinity of striatal D^2 receptors for antagonist, but not for agonist, nor in the D^2 receptor mRNA levels in the rat substantia nigra. X.M. LI, M. ZOLI, N. LE NOVÈRE, U.B. FINNMAN, N. LE NOVÈRE, J.P. CHANGEUX & K. FUXE. *Brain Res.* 679, 157-167.

— Developmental regulation of nicotinic receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous system. M. ZOLI, N. LE NOVÈRE, J. HILL & J.P. CHANGEUX. *J. Neurosci.* 15, 1912-1939.

— Nerve-dependent plasticity of the Golgi complex in skeletal muscle fibres : compartmentalization within the subneural sarcoplasm. B.J. JASMIN, C. ANTONY, J.P. CHANGEUX & J. CARTAUD. *Eur. J. Neurosci.* 7, 470-479.

— Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. M. PICCIOTTO, M. ZOLI, C. LÉNA, A. BESSIS, Y. LALLEMAND, N. LE NOVÈRE, P. VINCENT, E. MERLO PICH, P. BRÛLET & J.P. CHANGEUX. *Nature*, 374, 65-67.

— Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor : an example of multigene family in excitable cells. N. LE NOVÈRE & J.P. CHANGEUX. *J. Mol. Evol.* 40 155-172.

— Synaptoarchitecture of the occipital cortex in macaque monkey devoid of retinal input from early embryonic stages. J.P. BOURGEOIS & P. RAKIC. (soumis).

— A kinetic mechanism for nicotinic acetylcholine receptors based on multiple allosteric transitions. S. EDELSTEIN, O. SCHAAD, E. HENRY, D. BERTRAND & J.P. CHANGEUX (soumis).

Revues :

— Neurotransmitter receptors in the changing brain : signal transduction, gene expression and pathology at the molecular level. J.P. CHANGEUX. *In* : « Individual Development over the Lifespan : Biological and Psychosocial Perspectives ». Nobel Symposium 1994, D. MAGNUSSON, ed. The Cambridge University Press (sous presse).

— Neuronal nicotinic receptors : Molecular organization and regulations. J.L. GALZI & J.P. CHANGEUX. *Neuropharmacology*, 34, 563-582

— Ligand-gated ion channels as unconventional allosteric proteins. J.L. GALZI & J.P. CHANGEUX. *In* : Challenges and Perspectives in Neuroscience, eds. D. OTTOSON et al. (sous presse).

— The acetylcholine receptor : a model for allosteric membrane proteins. J.P. CHANGEUX. *Biochemical Society Transactions*, Vol. 23 (Thudichum Medal Lecture, London, delivered at Imperial College London, December 1993), pp. 195-205.

— Nicotinic receptor : an allosteric protein specialized for intercellular communication. D. BERTRAND & J.P. CHANGEUX. *Seminars Neurosci.* 7, 75-90.

— Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. A. DUCLERT & J.P. CHANGEUX. *Physiological Rev.* 75, 339-368.

— Electrophysiology of neuronal nicotinic receptors in the CNS. C. MULLE, C. LÉNA & J.P. CHANGEUX. *In* : « Effects of Nicotine on Biological Systems II ». *Advances in Pharmacological Sciences*, Birkhäuser Verlag Basel, pp. 127-135.

— Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the brain. C. VIDAL & J.P. CHANGEUX. *News in physiological Sciences* (in press).

— Coherent evolution of genome structure and DNA repair mechanisms : the control of mutation. M. KERSZBERG. *Proc. Royal Soc. Biol. Sci.* (sous presse).

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

Jean-Pierre CHANGEUX :

— Conférence, International Symposium on Nicotine, Montréal, Canada, 21-24 juillet 1994.

— Conférence, 10th European Society for Neurochemistry Meeting, Jérusalem, Israël, 14-17 août 1994.

— Cours, International Summer School on « Molecular mechanisms of transcellular signalling from the membrane to the gene », Island of Spetsai, 14-26 août 1994.

— Conférence, 19^e Symposium européen INSERM du Mont-Saint-Odile « Hormones et régulation cellulaire », 16 septembre 1994.

— Conférence de Conclusion : Conférence Philippe Laudat « Les récepteurs nicotiniques neuronaux : diversité, fonctions et pathologie », Strasbourg, 16-20 octobre 1994.

— Conférence, « The nicotinic acetylcholine receptor », Institut de Biochimie, Université de Berlin, Allemagne, 1^{er} novembre 1994.

— Conférence, Séance inaugurale, « Neurotransmetteurs et neurorécepteurs dans la maladie mentale », 2^e Salon International de Psychiatrie et SNC, CNIT Paris La Défense, 2 novembre 1994.

— Conférence, International Symposium on the Cholinergic Synapse, Baltimore, Maryland, USA, 5-10 novembre 1994.

— Conférence, Colloque Wright pour la Science « Cerveau et intelligence », Genève, Suisse, 4-10 décembre 1994.

— Conférence, Colloque Fondation Ipsen « Biologie de la prise de décision », Paris, décembre 1994.

— Séminaire « Regulation of acetylcholine receptor genes expression during development in muscle and brain », University of California, San Diego, USA, 5 janvier 1995.

— Conférence, Symposium « Uniqueness and universality in a biological world », Palais de l'UNESCO, Paris, 10-12 janvier 1995.

— *Hebb Lecture*, « The functional architecture of nicotinic receptor : a prototype of ligand-gated ion channels », Amsterdam, Pays-Bas, 26 janvier 1995.

— Conférence, Symposium en l'honneur des 60 ans de Terje Lomo « Activity-dependent synaptic plasticity », Université d'Oslo, Norvège, 27 janvier 1995.

— Conférence, Colloque scientifique organisé par la Fondation de la Maison de la Chimie « Molécules, Matériaux et Mémoire », Paris, 31 janvier 1995.

— Conférence « Le regard du neurobiologiste sur les fondements de l'éthique », Centre d'Etudes Saint-Louis de France, Rome, Italie, 9 février 1995.

— Conférence « Spatio-temporal patterns of acetylcholine receptor genes expression during development in muscle and brain », Brain Research Institute, Université de Zürich, Suisse, 15 février 1995.

— *First Jus Lecture*, « The viewpoint of a neuroscientist on the foundations of ethics », Centre de Bioéthique, Université de Toronto, Canada, 20 février 1995.

— Conférence, Colloque d'Hommage à Ignace Meyerson, Université Paris XII, Créteil, 10 mars 1995.

— Conférence, ECBO Meeting « Cell Biology of the synapse », Heidelberg, Allemagne, 5-8 Avril 1995.

— Conference on « Molecular neurobiology of receptors », Acquafredda di Maratea, Italie, 22-26 avril 1995.

— Conférence, Colloque « Pourquoi la Science ? Impact et limites de la recherche scientifique », Université Catholique de Louvain, Belgique, 1^{er} juin 1995.

— Conférence, 9th International Symposium on cholinergic mechanisms, Mayence, Allemagne, 7-9 juin 1995.

Jean-Pierre BOURGEOIS :

— Conférence « Synaptogenesis in neocortex of primates », 12th World Congress of Neuropathology, Toronto, Canada, novembre 1994.

— Colloque Fondation Ipsen « Biologie de la prise de décision », Paris, décembre 1994.

— Colloque « Cerebral Cortex Function and Development », Lyon, mai 1995.

— Conference « Synaptogenesis in the prefrontal cortex of primates », 9th International Conference on Infant Studies, Paris, mai 1995.

Anne DEVILLERS-THIÉRY :

— Conférence d'Introduction et conférence « Domaines fonctionnels du récepteur nicotinique : le site de liaison de l'acétylcholine », Conférence Philippe Laudat, Strasbourg, octobre 1994.

— Conférence « Functional architecture of the nicotinic receptor », Institut Weizmann, Rehovot, Israël, décembre 1994.

— Conférence « Functional architecture of the nicotinic receptor », Université Hébraïque de Jérusalem, Israël, décembre 1994.

Aymeric DUCLERT :

— Conférence « Formation and maintenance of the neuromuscular junction », 11th National Meeting, The Brain Research Association, Southampton, U.K., avril 1994.

Stuart EDELSTEIN :

— Conférence « Un mécanisme cinétique pour les récepteurs nicotiques basé sur les différents états allostériques », Conférence Philippe Laudat, Strasbourg, octobre 1994.

Jean-Luc GALZI :

— Conférence « Functional architecture of nicotinic receptors », USGEB Symposium, Berne, Suisse, 1994.

— Conférence « Domaines fonctionnels du récepteur nicotinique : le canal ionique », Conférence Philippe Laudat, Strasbourg, octobre 1994.

— Conférence « Allosteric regulation of the nicotinic acetylcholine receptor », Recent Advances in Neurobiology, Tokyo, janvier 1995.

Jean-Luc EISELÉ :

— Cours International Théorique et Pratique sur « l'analyse biochimique, immunologique et fonctionnelle des antigènes de surface des Lymphocytes », organisé par l'Unesco et l'Institut Pasteur de Tunis, 15 mars-9 avril 1994.

— Séminaire « Expression de protéines recombinantes dans le baculovirus », Institut Pasteur, Tunis, juin 1995.

Michel KERSZBERG :

— European Society for ChemoReception, Blois, juillet 1994.

Hoàng-Oanh NGHIEM :

— 17^e Réunion du Groupe Développement. « Développement du système nerveux », Paris, mai 1994.

Marina PICCIOTTO :

— Conférence « Inactivation par recombinaison homologue de la sous-unité $\beta 2$ du récepteur nicotinique neuronal », Conférence Philippe Laudat, Strasbourg, octobre 1994.

Catherine VIDAL :

- International Symposium on Nicotine, Montréal, Canada, juillet 1994.
- Conférence « Les récepteurs nicotiques du cerveau : relations structure-fonction et rôles physiologiques », Groupement d'Etudes Biologiques, Lausanne, Suisse, mars 1995.
- Conférence « Nicotinic receptors in the brain : molecular biology, function and therapeutics », 3rd Congress on Neurodegenerative Disorders, Ocho Rios, Jamaïque, avril 1995.

Michele ZOLI :

- Conférence « Distribution des sous-unités des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine dans le système nerveux du rat en développement et chez l'adulte », Conférence Philippe Laudat, Strasbourg, octobre 1994.

DISTINCTIONS

Jean-Pierre CHANGEUX :

- Grand' Croix dans l'Ordre National du Mérite, février 1995.

Jean-Luc GALZI :

- Médaille de Bronze du CNRS, 1994.

Aaron BENSIMON :

- Prix Jacques Monod de l'Institut Pasteur, 1994.