

## La biologie de la conformation dans la régulation des phénotypes cellulaires senescent et transformé

par Alvaro Macieira-Coelho\*

INSERM, 73bis, rue Maréchal Foch, 78000 Versailles. maceiracoelho@aol.com

Reçu le 7 avril 2004

### RÉSUMÉ

Le cytosquelette et la membrane cytoplasmique des cellules normales somatiques sont modifiés pendant la prolifération. La perte du potentiel de division est due en partie à ces modifications structurales qui induisent une diminution de la flexibilité de conformation. Pendant la transformation virale, les modifications du cytosquelette et de l'affinité de la cellule envers la matrice extracellulaire et les cellules voi-

sines augmentent la capacité migratoire et maintiennent la flexibilité de conformation nécessaire à l'initiation du cycle de division. Nous avons pu moduler la prolifération et la différenciation cellulaires et le phénotype transformé, en modifiant la charge électrique du substratum. Les résultats démontrent que la biologie de conformation est fondamentale pour l'expression de ces propriétés cellulaires.

### SUMMARY The biology of conformation in the regulation of the senescent and transformed cell phenotypes

The cytoskeleton and the cytoplasmic membrane of normal somatic cells are modified during proliferation. The loss of the division potential during serial proliferation is due in part to these structural modifications that induce a decline in the cell conformational flexibility. During viral transformation, the changes in the cytoskeleton and in the affinity of the cell to its matrix and to neighboring cells increase the

cell migratory capability, maintaining the conformation flexibility needed for the initiation of the division cycle. We could modulate cell proliferation, transformed phenotype, and differentiation by changing the electric charge of a substratum. Results support the view that the biology of conformation is crucial for the expression of these cell properties.

### RÔLE DE LA FLEXIBILITÉ DE CONFORMATION DANS L'INITIATION DE LA SYNTHÈSE D'ADN

Les fibroblastes normaux subissent pendant des divisions successives des modifications du cytosquelette et de la membrane; ces modifications se traduisent par une évolution de la morphologie et du volume cellulaire qui sont couplées avec le déclin de la probabilité de se diviser.

La relation entre modifications du volume et division cellulaires a été abordée avec différentes technologies. Le marquage à la thymidine tritiée (Bowman *et al.*, 1975), l'analyse par cinématographie (Absher & Absher, 1976) et la comparaison entre volume cellulaire et temps de doublement (Mitsui & Schneider, 1976) ont tous abouti à la conclusion que l'augmentation du volume cellulaire diminue la probabilité de déclencher le cycle de division. Des concentrations augmentées de facteurs de croissance et une surface plus grande d'attachement deviennent nécessaires pour initier le cycle de division (Collins, 1979).

Dans les fibroblastes de Poulet, la première augmentation détectable du volume cellulaire a lieu autour du quinzième doublement de population et coïncide avec le prolongement du temps nécessaire pour atteindre l'activité maximale de synthèse d'ADN (Lima & Macieira-Coelho, 1972). Elle est suivie par une prolongation du temps de doublement. Vers la fin de l'activité proliférative, le volume cellulaire augmente de nouveau juste avant le stade terminal post-mitotique.

Chez les fibroblastes humains le pourcentage de cellules synthétisant l'ADN, pendant les premières 24 heures après la subculture, décline progressivement au cours de la vie proliférative de la population cellulaire (Macieira-Coelho & Azzarone, 1990). Le pourcentage maximal de cellules entrant en division, entre la subculture et le jour où les cellules atteignent la densité de saturation, décline pendant les dernières divisions et coïncide avec une augmentation significative du volume cellulaire. Ces modifications suivent l'évolution de la densité et de l'espacement des fibres de chromatine (Macieira-Coelho, 1990). La densité décline progressivement,

\* Cet article fait partie du thème « Régulations épigénétiques » (*J. Soc. Biol.*, 2004, n° 3, pp. 257-298).

l'espace augmente seulement pendant les dernières divisions avec l'augmentation dramatique du volume cellulaire. Ces modifications au niveau supramoléculaire se traduisent morphologiquement par une augmentation des surfaces nucléolaire et nucléaire (BeMiller & Miller, 1979).

Ces changements sont accompagnés par des modifications de la contractilité cellulaire évaluée par la capacité de rétraction d'un caillot de fibrine (Macieira-Coelho & Azzarone, 1990). Le déclin de la contractilité est couplé avec le déclin de la fraction cellulaire capable de synthétiser l'ADN pendant une période de 24 heures. Ces résultats montrent un couplage entre modifications du volume cellulaire, fonction du cytosquelette, organisation des fibres de chromatine et difficultés croissantes dans la synthèse d'ADN.

Les cellules terminales post-mitotiques présentent des mouvements membranaires réduits et la macropinocytose est presque totalement absente (Blomqvist *et al.*, 1978).

### DÉPENDANCE DU PHÉNOTYPE TRANSFORMÉ DE LA FLEXIBILITÉ DE CONFORMATION

Des fibroblastes humains normaux ont été transformés par le virus du sarcome de Rous (RSV) et le SV40 et des fibroblastes bovins par le RSV. Les cellules transformées ont en commun le fait de continuer de proliférer à des densités où les témoins respectifs entrent en phase de repos, mais elles diffèrent dans l'expression du phénotype transformé (Macieira-Coelho, 1967a).

Les fibroblastes humains transformés par le RSV n'ont pas tendance à se chevaucher et présentent une forte affinité envers le substratum. La courbe de croissance atteint un plateau avec une densité cellulaire élevée. La synthèse d'ADN s'arrête quand chaque cellule est attachée à la plus petite aire de substratum possible (Macieira-Coelho, 1967b).

Les fibroblastes bovins transformés par le RSV adhèrent bien au substratum et ont tendance à se chevaucher. Les courbes de croissance n'arrivent jamais à un plateau et la densité cellulaire croît progressivement. La synthèse d'ADN ne s'arrête pas parce que les cellules en se chevauchant ont toujours un nouveau substratum pour proliférer. Ces mouvements cellulaires peuvent s'expliquer par l'haptotaxis (Carter, 1965) : les cellules en culture tendent à migrer vers le substratum avec lequel elles ont plus d'affinité.

Les fibroblastes transformés par le SV40 n'ont pas tendance à se chevaucher, les cellules adhèrent mal au substratum, se détachent facilement et laissent de nouvelles aires disponibles pour que la prolifération se maintienne. La synthèse d'ADN est maintenue à des niveaux élevés (Macieira-Coelho, 1967a).

Ces résultats ont suggéré que l'on puisse modifier la prolifération et l'expression du phénotype transformé par la modulation de l'attachement des cellules au substratum.

### MODULATION DU PHÉNOTYPE TRANSFORMÉ PAR L'ATTACHEMENT DES CELLULES AU SUBSTRATUM

Nous avons adapté à la culture cellulaire (Macieira-Coelho & Avrameas, 1972) un polymère d'albumine de sérum bovin (ASB). La polymérisation de ASB est due à des pontages créés par des liaisons entre les groupes aminés des protéines et les groupes aldéhydes du glutaraldéhyde. Après la polymérisation il y a des groupes aldéhydes qui restent libres à la surface, auxquels peuvent s'attacher par des liaisons covalentes des substances comme la polylysine ayant des groupes amines libres. Les substances comme l'héparine et le DEAE-dextran se lient au polymère par des liaisons non-covalentes. L'héparine se lie à des groupes chargés positivement (ex., groupes amines) et le DEAF-dextran à des groupes chargés négativement (ex., groupes carboxyl) du ASB. On peut ainsi obtenir un substratum avec différentes propriétés physicochimiques.

La lignée L de cellules transformées de souris, qui prolifère en monocouche sur du plastique, a été maintenue sur des surfaces à charge négative couvertes d'acide polyglutamique. Les cellules ont proliféré en amas et ont atteint un nombre plus élevé que les cellules proliférant sur des surfaces chargées positivement traitées à la polylysine. Vu en microscopie électronique, l'attachement de ces cellules sur les surfaces respectives présente une solution de continuité entre la membrane cellulaire et le substratum couvert avec l'acide polyglutamique, tandis que l'attachement à la surface traitée avec la polylysine est caractérisé par la continuité (Macieira-Coelho & Avrameas, 1972).

L'agrégation ou la monocouche sont dues à la charge électrique du substratum puisque toutes les surfaces neutres ou négatives causent la formation de cellules rondes poussant en agrégats, tandis que la charge positive cause l'étalement cellulaire indépendamment d'autres propriétés comme le pH auquel l'acide polyamine est isoionique, ou les formes I ou d des molécules. Le degré de liaison du polyacide aminé avec le substratum ou les différences de structure n'influencent pas le comportement cellulaire. La nature critique de la charge a été démontrée, en couvrant le substratum avec différentes proportions de lysine et d'alanine (Macieira-Coelho *et al.*, 1974). Le nombre de cellules attachées est proportionnel à la quantité de lysine. Le polymère n'a pas d'effet direct sur le métabolisme cellulaire puisque des substances attachées au substratum ne pénètrent pas dans la cellule. Des substances capables d'influencer le métabolisme cellulaire quand elles sont en solution, comme la polyornithine qui stimule le transport des protéines, perdent cette propriété quand elles sont attachées au substratum. Les résultats ont aussi démontré que le sérum polymérisé, utilisé comme substratum, perd ces propriétés nutritionnelles et de stimulation de la prolifération cellulaire (Macieira-Coelho *et al.*, 1974). De plus les facteurs de croissance perdent leur propriété mitogène quand ils sont attachés au substratum (Avrameas *et al.*, 1976).

## MODULATION DE LA MALIGNITÉ PAR DES CHANGEMENTS DE L'ATTACHEMENT CELLULAIRE AU SUBSTRATUM

Nous avons obtenu d'autres résultats montrant l'importance de la conformation de la cellule sur le phénotype transformé. La lignée L12 10 de cellules leucémiques de Souris qui normalement prolifère *in vitro* en suspension a été maintenue dans des flacons couverts avec un polymère de ASB couvert de polylysine (Macieira-Coelho & Avrameas, 1973). Quelques cellules ont progressivement perdu la forme ronde en s'attachant au substratum et assumant une forme fibroblastique. Pendant des subcultures successives avec la trypsine toutes les cellules rondes ont disparu. Les cellules qui avaient acquis le nouveau phénotype ont perdu le potentiel de malignité. En effet tandis que  $10^5$  cellules leucémiques étaient suffisantes pour tuer une souris, les animaux survivaient tous après injection de  $10^8$  cellules dotées de propriétés adhésives.

Les L1210 fibroblastiques ont été subcultivés pendant un an correspondant à plus de 200 doublements. Après cette période nous avons détecté des cellules rondes proliférant en suspension ; elles ont été séparées du reste de la population proliférante attachée au substratum. Cette population de cellules rondes avaient récupéré le potentiel leucémique, quoique pas totalement, puisque  $10^6$  cellules prenaient plus de temps pour tuer les animaux et qu'une souris survécut à cet inoculum (Macieira-Coelho & Avrameas, 1973).

## DISCUSSION

Le terme « biologie de la conformation » a été utilisé par Ivanov *et al.* (1983) pour définir les propriétés de l'ADN dues à différentes formes et transitions de la double hélix. Le terme peut être utilisé en biologie cellulaire pour expliquer les propriétés cellulaires acquises à la suite de transitions phénotypiques.

On sait depuis les observations de Loeb et Fleisher (1919) que l'initiation du cycle de division nécessite des mouvements cellulaires. Comme l'a suggéré Puck (1977), le cytosquelette pourrait être le lien qui transmet l'information régulant la prolifération cellulaire. Mais quelle pourrait être la nature de cette information ?

Il faut rappeler que l'ADN d'une cellule animale est une molécule de plus d'un mètre de longueur, confinée dans une sphère, le noyau, d'un diamètre d'environ 5  $\mu\text{m}$ . Ceci implique un paquetage élaboré contrôlé entre autres par l'ancrage de l'ADN à une matrice de protéines. L'échafaudage sur lequel la chromatine est ancrée joue un rôle fondamental dans l'organisation de la superstructure de l'ADN. Il y a en effet une structure protéique appelée la matrice nucléaire, à laquelle l'ADN est associé. Les sites d'initiation de la synthèse d'ADN sont préférentiellement situés à la périphérie du noyau entre la chromatine condensée et les régions interchromatiniennes, suggérant un rôle important de la matrice nucléaire dans l'initiation

de la synthèse d'ADN (Berezney & Coffey, 1975). L'ancrage de l'ADN est crucial, non seulement pour la répllication mais aussi pour la transcription, puisque l'ARN naissant est associé à la cage nucléaire (Jackson *et al.*, 1984).

La lamina, un réseau protéique filamenteux bordant la surface nucléoplasmique de l'enveloppe nucléaire, doit fournir un site d'ancrage pour la chromatine interphasique à la périphérie du noyau (Gerace, 1985). Quand la coquille nucléaire est isolée, elle contient des structures chromatiniennes faites de paquets de nucléosomes épais de 28-32 nm identiques à la structure solénoïde, qui sont associées aux trois lamines nucléaires (Bouvier *et al.*, 1985). La lamina est composée de protéines appelées lamines qui semblent être des structures intermédiaires entre les protéines liées à l'ADN et le cytosquelette. En effet la lamina peut être dissociée de la chromatine seulement par des solutions à concentration élevées de sels, les mêmes utilisées pour extraire les histones du nucléosome (Bouvier *et al.*, 1985). De plus, les lamines ont une homologie de séquence significative avec les filaments intermédiaires qui sont des composants du cytosquelette (Gerace, 1985).

L'ancrage de la chromatine se fait ainsi avec la préservation de la continuité avec l'échafaudage cytoplasmique ; l'ADN à travers son ancrage à la cage nucléaire est lié au cytosquelette et *via* ce dernier à la membrane cellulaire et la matrice extracellulaire. La matrice nucléaire et le cytosquelette sont des intégrateurs non seulement d'espace mais aussi de fonction dans la cellule. Cette structure doit être envisagée comme une entité tridimensionnelle articulée (Thurston & Weeks, 1984) où l'information circule en large mesure par des modifications des configurations moléculaires. Le comportement cellulaire est déterminé par la façon dont ce réseau est connecté, par sa topologie. La création de nouvelles contraintes topologiques permettant la transmission de l'information dans la cellule dépend de la flexibilité de conformation.

La flexibilité aux niveaux moléculaire et cellulaire est achevée à travers la mobilisation d'énergie. Les molécules assument des conformations structurales ayant un potentiel énergétique minimal. Le transfert d'information se fait par des modifications de conformation qui consomment de l'énergie. Ceci est contrôlé par la phosphorylation et la déphosphorylation, et par des gradients de potentiel électrique créés par des courants d'électrons, de protons et d'ions, qui activent des barrières d'énergie comme les membranes. La matrice extracellulaire exerce un effet rétroactif sur le génome réglant l'expression des gènes à travers des modifications de la flexibilité de conformation et la création de nouvelles contraintes topologiques.

Les modifications de la configuration de l'échafaudage cellulaire induites par des mouvements membranaires et cytoplasmiques transportent le message au noyau pour l'initiation de la synthèse d'ADN, créant la conformation de la chromatine favorable à l'expression des gènes qui doivent être activés pendant la période G1. De plus, la position stérique des sites d'initiation doit être cruciale pour le commencement de la période S ; la

contraction des structures nucléaires ou inversement l'étalement excessif conduit à l'arrêt du cycle de division. La contraction a lieu pendant l'inhibition de contact et l'étalement pendant la phase terminale de la vie proliférative des fibroblastes. Dans les deux cas, la probabilité est faible pour que la structure de la chromatine assume la conformation adéquate et pour que les sites d'initiation acquièrent une position stérique favorable à l'initiation et à la progression du cycle de division. Au contraire, des mouvements rapides augmentent la probabilité d'atteindre une configuration favorable à l'initiation de la synthèse d'ADN (Macieira-Coelho, 1980).

Au cours de proliférations successives les cellules subissent des réorganisations génomiques pendant le cycle de division qui conduisent à une réorganisation structurale modifiant le volume cellulaire et l'attachement au substratum, diminuant la flexibilité de conformation supramoléculaire (Macieira-Coelho, 1990). L'infection par des virus oncogènes modifie la membrane et le cytosquelette, créant de nouvelles propriétés qui permettent aux cellules la motilité dans des conditions où les cellules normales s'immobilisent. L'acquisition de la flexibilité de conformation à travers la migration maintient les cellules en état de prolifération.

Le mécanisme d'action des protooncogènes et de leurs dérivés, les oncogènes, concerne la phosphorylation; en effet leurs produits interviennent dans la phosphorylation de plusieurs substrats. C'est pour cette raison qu'ils interviennent dans plusieurs processus comme le développement, la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire. Contrairement à ce que l'on peut lire dans la littérature scientifique, les oncogènes ne peuvent pas à eux seuls induire la transformation maligne, ils contribuent au dérèglement de voies métaboliques créant les conditions nécessaires à l'échappement progressif à l'homéostasie.

Plusieurs travaux suggèrent la présence d'une dérégulation de la phosphorylation au cours de la transformation cellulaire. Le produit de l'oncogène *src*, par exemple, est une kinase plus active que le produit de son protooncogène; en effet il peut accélérer la maturation des oocytes induite par la progestérone (Spivack *et al.*, 1984). De même dans les fibroblastes transformés par *v-src* il y a une augmentation de la phosphorylation du groupe tyrosyl de JAK1 causant une activation constitutive de la kinase (Campbell *et al.*, 1997). Ceci est dû à la perte d'une extrémité de la protéine *src* où se trouve une tyrosine qui maintient la molécule dans sa forme inactive (Hubbard & Till, 2000). Une tyrosine phosphorylée a une énergie libre de 2,98 kcal/mol; ceci est moindre que l'énergie libre correspondante à l'hydrolyse de l'ATP, 7,6 kcal/mol. Cependant la phosphorylation incontrôlée de la tyrosine va produire une augmentation significative de l'énergie libre disponible avec modifications du flux d'information. Le changement fondamental est l'acquisition d'un potentiel accru de transfert d'un groupe phosphate avec augmentation de la probabilité d'activation des barrières d'énergie. Il n'y a pas d'effet spécifique des oncogènes sur la transformation maligne. Leurs produits agissent en différents points du réseau cellulaire, aug-

mentant la mobilisation et la transduction d'énergie. Des modifications de l'expression des oncogènes par des mutations, amplifications, transpositions ou recombinaisons, conduisent à des déviations de l'homéostasie car leurs produits agissent au niveau le plus fondamental de la vie cellulaire: le transfert d'énergie. Le futur de la biologie cellulaire dépend en grande partie de la compréhension de ce système de traitement de l'information.

Le système expérimental décrit ci-dessus démontre comme l'attachement cellulaire à un substratum peut conditionner le transfert de l'information de la périphérie au génome. Nous avons démontré l'effet de l'attachement cellulaire sur l'expression génétique, en modulant la différenciation de myoblastes par des variations de l'attachement cellulaire (Wahman *et al.*, 1981; Sénéchal *et al.*, 1984). Nos résultats ont démontré que la transmission de l'information est due à des forces physiques.

Dans les cellules dépendantes d'un substrat, conformation moléculaire et fonction sont couplées à travers la tension dans l'échafaudage qui s'étend de la périphérie à la cage nucléaire. La tension de l'échafaudage est contrôlée par la synthèse de molécules qui possèdent une configuration stérique adéquate. L'adhésion à un substratum est le mécanisme déclencheur de la tension structurale. Le comportement cellulaire est déterminé par la façon dont ce réseau structural est connecté, en bref sa topologie. Le maintien de la flexibilité de conformation par des variations des interactions cellules/matrice, permet la création de nouvelles contraintes topologiques et la transmission du flux d'information.

## BIBLIOGRAPHIE

- Absher P. M. & Absher R. G., Clonal variation and aging of diploid fibroblasts. *Cinematographic studies of cell pedigrees. Exp. Cell. Res.*, 1976, 103, 247-255.
- Avrameas S., Ternynck T. & Macieira-Coelho A., Loss of mitogenic activity by immobilized lectins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, 72, 790-795.
- BeMiller P. M. & Miller J. E., Cytological changes in senescing WI-38. A statistical analysis. *Mech. Ageing. Dev.*, 1979, 10, 1-15.
- Berezney R. & Coffey D. S., Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA. *Science*, 1975, 189, 291-293.
- Blomquist E., Arro E., Brunk U. & Westermark B., Plasma membrane motility of cultured human glia cells in phase II and III. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Pathol.*, 1978, 86, 257-263.
- Bouvier D., Hubert J., Seve A. P. & Bouteille M., Characterization of lamina-bound chromatin in the nuclear shell isolated from HeLa cells. *Exp. Cell. Res.*, 1985, 93, 184-190.
- Bowman P. D., Meek R. L. & Daniel C. W., Aging of human fibroblasts *in vitro*, correlation between DNA synthetic ability and cell size. *Exp. Cell. Res.*, 1975, 93, 184-190.
- Campbell G. S., Yu C. L., Love R. & Carter-Su C., Constitutive activation of JAK1 in *src*-transformed cells. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 2591-2594.
- Carter S. B., Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion. *Nature*, 1965, 208, 1183-1187.
- Collins V. P., Arro E., Blomquist A., Brunk U., Frederikson B. A. & Westermark B. A., Cell locomotion and proliferation in

- relation to available surface area, serum concentration and culture age. Scanning. *Electron. Microsc.*, 1979, 111, 411-420.
- Gerace L., Structural proteins in the eukaryotic nucleus. *Nature*, 1985, 318, 508-509.
- Hubbard S.R. & Till J.H., Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.*, 2000, 69, 373-398.
- Ivanov V. I., Minchenkova L. E., Minyat E. E. & Schyolkina A. K., Cooperative transitions in DNA with no separation of strands. *Cold Spring Harbor Symp.*, 1983, 47, 243-250.
- Jackson D. A., McCready S. J. & Cook P. R., Replication and transcription depend on attachment of DNA to the nuclear cage. *J. Cell. Phys.*, 1984, 1, 59-79.
- Lima L. & Macieira-Coelho A., Parameters of aging in chicken embryo fibroblasts cultivated *in vitro*. *Exp. Cell. Res.*, 1972, 70, 279-284.
- Loeb L. & Fleischer M. S., Cell migration and division. *J. Med. Res.*, 1919, 40, 405-515.
- Macieira-Coelho A., Relationship between DNA synthesis and cell density in normal and virus transformed cells. *Int. J. Cancer*, 1967a, 2, 296-303.
- Macieira-Coelho A., Dissociation between inhibition of movement and inhibition of division in RSV transformed human fibroblasts. *Exp. Cell. Res.*, 1967b, 47, 193-200.
- Macieira-Coelho A. & Avrameas S., Modulation of cell behavior *in vitro* by the substratum in fibroblastic and leukemic mouse cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 2469-2473.
- Macieira-Coelho A. & Avrameas S., Protein polymers as a substratum for the modulation of cell proliferation *in vitro*, in Tissue Culture, Methods and Applications, Kruse Jr. P. F. & Patterson Jr. M. K. (eds), 1973, Academic Press, New York, 379-383.
- Macieira-Coelho A., Berumen L. & Avrameas S., Properties of protein polymers as substratum for cell growth *in vitro*. *J. Cell. Phys.*, 1974, 83, 379-388.
- Macieira-Coelho A., Changes in membrane properties associated with cellular aging. *Int. Rev. Cyt.*, 1983, 83, 183-220.
- Macieira-Coelho A., Chromatin reorganization during senescence of proliferating cells. *Mutat. Res.*, 1990, 256, 81-104.
- Macieira-Coelho A. & Azzarone B., Correlation between contractility and proliferation in human fibroblasts. *J. Cell. Phys.*, 1990, 142, 610-614.
- Mitsui Y. & Schneider E. L., Relationship between cell replication and volume in senescent human diploid fibroblasts. *Mech. Ageing. Dev.*, 1976, 5, 45-56.
- Puck T. T., Cyclic AMP, the microtubule-microfilament system and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 4491-4495.
- Sénéchal H., Wahrmann J. P., Delain D. & Macieira-Coelho A., Modulation of differentiation *in vitro*. II. Influence of cell spreading and surface events on myogenesis. *In Vitro*, 1984, 20, 692-698.
- Spivack J. G., Prusoff W. H. & Tritton T. R., Microinjection of pp6OV-src into *Xenopus* oocytes increases phosphorylation of ribosomal protein S6 and accelerates the rate of progesterone-induced meiotic recombination. *Mol. Cell. Biol.*, 1984, 8, 1631-1634.
- Thurston P. W. & Weeks J. R., The mathematics of three-dimensional manifolds. *Sci. Am.*, 1984, 94-106.
- Wahrmann J. P., Delain D., Bournoutian C. & Macieira-Coelho A., Modulation of differentiation *in vitro*. Influence of the attachment surface on myogenesis. *In Vitro*, 1981, 17, 752-762.

