

DIGITHÈQUE

Université libre de Bruxelles

Revue de l'Université de Bruxelles, 1983/1-2, Bruxelles : Université Libre de Bruxelles, 1983.

http://digistore.bib.ulb.ac.be/2011/DL2503255_1983_1_2_000.pdf

Cette œuvre littéraire est soumise à la législation belge en matière de droit d'auteur.

Elle a été publiée par l'**Université Libre de Bruxelles** et numérisée par les Archives & Bibliothèques de l'ULB.

Tout titulaire de droits sur l'œuvre ou sur une partie de l'œuvre ici reproduite qui s'opposerait à sa mise en ligne est invité à prendre contact avec la Digithèque de façon à régulariser la situation (email : [bibdir\(at\)ulb.ac.be](mailto:bibdir(at)ulb.ac.be)).

Les règles d'utilisation de la présente copie numérique de cette œuvre sont visibles sur la dernière page de ce document.

L'ensemble des documents numérisés mis à disposition par les Archives & Bibliothèques de l'ULB sont accessibles à partir du site <http://digitheque.ulb.ac.be/>



3-B/5
revue de l'université de bruxelles

éditions de l'université de bruxelles

de la molécule au mammifère

René Thomas - Jean-Pierre Boon - Christian Vandecasserie



revue
de l'université
de bruxelles
1983/1-2

Série «à l'enseigne de»
dirigée par Pierre Van der Vorst

Titres parus :

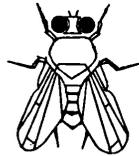
A l'enseigne du droit social belge

A l'enseigne de la braconnerie

De la molécule au mammifère

sous la direction de

René THOMAS
Jean-Pierre BOON
Christian VANDECASSERIE



à Hubert Chantrenne

comité de rédaction de la revue de l'université

directeur

Jacques Sojcher

comité de rédaction

Paul Bertelson, Jean Blankoff, Jean-Pierre Boon, Gilbert De Busscher, Jacques Devooght, Jean-Christophe Geluck, Michel Hanotiau, Hervé Hasquin, Robert Pirson, Ernest-Alfred Sand, Christian Vandecasserie, Pierre Van der Vorst.

secrétaire de rédaction

Adolphe Nysenholc

rédaction

Rue du Magistrat, 10 1050 Bruxelles Belgique
Tél. 02/649.93.31

secrétariat

Avenue Paul Héger, 26, 1050 Bruxelles Belgique
Tél. 02/649.00.30 ext. 3799

Revue publiée avec l'aide du Ministère de l'Éducation Nationale

Les articles n'engagent que leurs auteurs.

© 1983 by **Éditions de l'Université de Bruxelles**. Tous droits de traduction et de reproduction réservés pour tous pays.
Imprimé en Belgique.

Liste des collaborateurs

- J. Brachet, (Titre IX), Laboratoire de Cytologie et Embryologie moléculaires – ULB.
- H. Chantrenne, (Introduction et Titre I), Laboratoire de Chimie Biologique – ULB.
- C. Dambly-Chaudière, (Titre XIII), Laboratoire de Génétique – ULB.
- P. Delhaise, (Titre II), Laboratoire de Physiologie animale – ULB.
- M. Errera, (Titre III), Laboratoire de Biophysique et Radiobiologie – ULB.
- A. Ghysen, (Titres XIII, XIV), Laboratoire de Génétique – ULB.
- Y. Goldberg, (Titre XII), Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du développement – ULB.
- M. Guyaux, (Titre XII), Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du développement – ULB.
- R. Janson, (Titre XIV), Laboratoire de Génétique – ULB.
- R. Jeener, (Titre VII), Laboratoire de Physiologie animale – ULB.
- R. Kram, (Titre XII), Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du développement – ULB.
- M. Laurent, (Titre VI), Laboratoire de Cytologie et Embryologie moléculaires – ULB.
- J.-P. Lecocq, (Titre V), Directeur scientifique – Transgène.
- M. Lheureux, (Titre VI), Laboratoire de Cytologie et Embryologie moléculaires – ULB.
- E. Pays, (Titre VI), Laboratoire de Cytologie et Embryologie moléculaires – ULB.
- M. Rivière, (Titre XII), Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du développement – ULB.
- J. Schell, (Conclusions), Laboratorium voor Genetica, Rijksuniversiteit Gent.
- H. Schmitt, (Titre XII), Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du développement – ULB.
- M. Steinert, (Titre VI), Laboratoire de Cytologie et Embryologie moléculaires – ULB.
- E. Teugels, (Titre XIV), Laboratoire de Génétique – ULB.
- R. Thomas, (Titres IV, XIV), Laboratoire de Génétique – ULB.
- J. Urbain, (Titres II, VIII), Laboratoire de Physiologie animale – ULB.
- S. Van Assel, (Titre VI), Laboratoire de Cytologie et Embryologie moléculaires – ULB.
- T. Vanden Driessche, (Titre XI), Laboratoire de Cytologie et Embryologie moléculaires – ULB.
- P. Vandervorst, (Titre XIV), Laboratoire de Génétique – ULB.
- P. Van Gansen, (Titre X), Laboratoire de Cytologie et Embryologie moléculaires – ULB.
- M. Van Montagu, (Conclusions), Laboratorium voor Genetica, Rijksuniversiteit Gent.
- C. Wuilmart, (Titre II), Laboratoire de Physiologie animale – ULB.

Avertissement

POURQUOI LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ?

On peut s'étonner de la soudaine vogue de la biologie moléculaire : en elle-même, la mise à jour de mécanismes fondamentaux, si importants soient-ils et si satisfaisants soient-ils sous l'angle esthétique, arrive difficilement à dépasser le cercle des initiés. Ce qui a rendu populaires les derniers développements de la biologie moléculaire, c'est sans doute la mystérieuse conjonction de l'applicabilité et d'un relent de science fiction. Qui aurait cru, il y a vingt ans, qu'on pourrait fusionner une cellule d'homme et une cellule de rat et en tirer une lignée cellulaire viable ? Qui aurait cru, au moment où cette possibilité a été découverte, qu'elle permettrait la localisation des gènes humains sur les chromosomes ? Qui aurait cru il y a dix ans qu'on pourrait introduire dans des bactéries des gènes humains et leur faire produire de l'insuline ou de l'hémoglobine humaine ?

L'objectif exact de cet ouvrage a, pour diverses raisons, fluctué au cours des mois. Fallait-il tenter de donner une image de la biologie moléculaire en général, en Belgique, à l'Université de Bruxelles ... ? Fallait-il tenter la gageure de faire écrire par un ensemble d'une quarantaine d'auteurs un traité de biologie moléculaire ? Il nous a paru plus réaliste de demander à quelques-uns de faire une synthèse du travail de leur groupe, dans un contexte aussi général que possible.

Nous regrettons que nos collègues du groupe du Ceria n'aient pu fournir comme nous l'avions espéré une contribution à cet ouvrage. L'échantillonnage «local», complété par un texte d'un ancien collaborateur de l'Université, J. P. Lecocq, nommé récemment directeur scientifique de la Société de Biotechnologie française Transgène et par un texte de nos collègues J. Schell et M. Van Montagu de Gand, est néanmoins bien représentatif des tendances actuelles de la biologie moléculaire. Faut-il rappeler que le «groupe de Rhode» trouve son origine dans l'association de nos collègues R. Jeener et J. Brachet, il y a plus de quarante ans ? Le groupe initial du Rouge-Cloître, petit mais prestigieux, a

engendré un institut dont la taille avoisine les 200 personnes (dont 150 chercheurs) et dont les intérêts se sont beaucoup diversifiés.

La contribution du groupe aux développements actuels de la biologie moléculaire a été très importante, depuis la mise en évidence du rôle même des acides nucléiques par J. Brachet et R. Jeener jusqu'à l'isolement par A. Burny, G. Marbaix et H. Chantrenne du premier acide ribonucléique (RNA) messenger, celui de l'hémoglobine, en passant par la dénaturation de l'acide désoxyribonucléique (DNA).

L'une des originalités de ce groupe a été et reste une grande liberté dans le choix et la conduite des sujets de recherche, liée à un large éventail de types de personnalités. Nous espérons que cette remarque aidera le lecteur à comprendre l'hétérogénéité de cet ouvrage, et le rendra indulgent à cet égard. Les éditeurs n'iront pas jusqu'à «se laver les mains» en disant qu'ils ont simplement servi de boîte aux lettres aux auteurs, mais le moins qu'on puisse dire est qu'ils ont été très peu directifs.

Les auteurs ont tenté de rendre l'essentiel de leur démarche accessible aux non-biologistes, et, en particulier, d'éviter l'accumulation de détails de caractère technique. Il ne faut cependant pas s'attendre à pouvoir lire l'ensemble «comme un roman» et la lecture de certains textes pourrait requérir une feuille de papier et un crayon !

STRUCTURE DE L'OUVRAGE

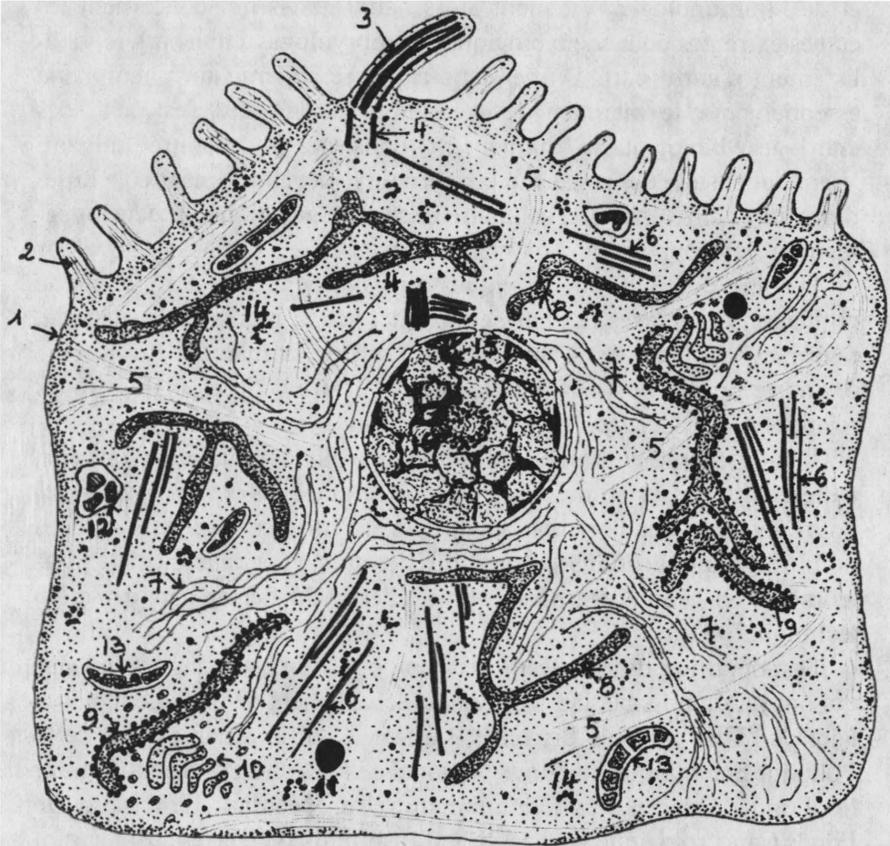
Comme le lecteur l'aura déjà pressenti à la lecture de l'avant dernier paragraphe, «structure» est un bien grand mot ; «texture» conviendrait sans doute mieux ! Cette texture peut être qualifiée de rhapsodique : les chapitres se succèdent dans un ordre logique peut-être, mais non évident. L'introduction générale retrace quelques étapes importantes de la biologie moléculaire moderne et offre un petit «glossaire» de notions de base essentielles. A partir de là on suivra un cheminement qui nous mènera du plus simple au plus complexe (ce qui ne signifie pas pour autant qu'on ira nécessairement de ce qui est bien compris à ce qui l'est moins). Des trois premiers chapitres dont la matière est la plus proche du niveau moléculaire, chapitres consacrés aux protéines et au DNA, on passera au niveau «supra-moléculaire», celui des microorganismes, virus, bactéries et protozoaires, qui font l'objet des trois textes suivants. Un nouveau pas sera franchi en abordant la complexité des organismes supérieurs : les chapitres qui suivent traitent des membranes cellulaires

et de l'immunologie. Viennent alors deux études qui concernent les étapes extrêmes de la vie biologique : l'embryologie d'une part, le vieillissement d'autre part. D'une étape à l'autre apparaît un phénomène essentiel pour le maintien de «l'équilibre de la vie», c'est celui des «horloges biologiques» auquel est consacré le chapitre suivant. Viennent ensuite des sujets qui concernent le développement et la différenciation : différenciation cellulaire et cancer, génétique du développement et développement du système nerveux. Ce volume s'achève par un chapitre quelque peu «exotique» : il s'agit de l'étude des circuits de régulation complexes. L'analyse porte ici sur la régulation génétique, mais ses applications s'étendent à d'autres domaines. Le lecteur optimiste pourra peut-être y voir une ouverture de la biologie vers les sciences plus «sociales».

Chaque chapitre est suivi de références bibliographiques dont certaines sont reprises en fin de volume, avec quelques commentaires qui pourraient faciliter l'orientation du lecteur curieux. Notons qu'ici les nombreuses publications scientifiques des auteurs et de leurs collaborateurs ont en général été passées sous silence du fait de leur caractère technique.

Il est opportun de saisir cette occasion pour remercier les organismes qui ont rendu possibles les travaux du département de biologie moléculaire de l'Université de Bruxelles : le Service de Programmation de la Politique Scientifique, le Fonds National de la Recherche Scientifique et les Fonds Associés, les Communautés Européennes, l'I.R.S.I.A., le Fonds Cancérologique de la CGER, l'Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie, ... Que les autorités académiques de l'Université, et tout particulièrement le Président Jaumotte et le Prorecteur Michot, trouvent ici un témoignage de gratitude pour leur aide inestimable.

René THOMAS
Jean-Pierre BOON
Christian VANDECASSERIE



- 1 membrane plasmique
 - 2 microvillosité
 - 3 cil
 - 4 centrioles
 - 5 microfilaments
 - 6 microtubules
 - 7 filaments intermédiaires
 - 8 réseau lisse (= réseau endoplasmique)
 - 9 réseau rugueux (= ergastoplasme)
 - 10 dictyosome (= appareil de Golgi)
 - 11 lysosome primaire
 - 12 lysosome secondaire (= vacuole digestive)
 - 13 mitochondrie
 - 14 polyribosome
 - 15 chromatine
 - 16 nucléole
- } «cytosquelette»
- } noyau

Schéma généralisé de cellule eucaryote animale (P. Van Gansen).
 Figure 1 de Molecular Cytology, J. Brachet, Academic Press, en préparation.

Hubert Chantrenne

L'idée de la biologie moléculaire

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Un profond renouvellement de la biologie a commencé vers le milieu de ce siècle et il se poursuit sous nos yeux : c'est le développement de la «Biologie moléculaire».

Les naturalistes avaient décrit des milliers d'organismes différents, et comparé leurs formes ; ils les avaient classés afin de mettre un peu d'ordre dans cette riche moisson. Ils étaient fascinés par l'inépuisable diversité des êtres, par la prodigieuse capacité d'adaptation et d'invention de la vie.

Des concepts fondamentaux se dégagèrent ; notamment la structure cellulaire des organismes, l'évolution, et les lois de l'hérédité ; des phénomènes très complexes furent observés et décrits avec une remarquable précision ; par exemple la division cellulaire, avec l'apparition des chromosomes et de l'étonnant appareil mitotique qui les répartit dans les cellules filles, la fécondation avec fusion des noyaux et le développement embryonnaire, ce prodigieux phénomène par lequel l'œuf fécondé, cellule unique, donne naissance par divisions successives à des milliards de cellules qui se diversifient mais restent associées et s'ordonnent en un organisme supérieur.

Les physiologistes avaient étudié le fonctionnement des animaux ou des plantes : digestion, contraction musculaire, transmission de l'influx nerveux, circulation du sang, mouvement de la sève, tropismes. Mais bien des problèmes fondamentaux de la biologie restaient sans solution. Que sont les gènes, ces êtres de raison inventés par les généticiens pour rendre compte de la transmission des caractères héréditaires ? Comment les constituants des organismes s'édifient-ils, s'associent-ils, comment leurs proportions s'ajustent-elles pour former des ensembles si bien coordonnés, si bien structurés ? Comment les organismes s'adaptent-ils aux variations du milieu ? Qu'est-ce qui détermine la

croissance, la morphogénèse, l'arrêt de croissance, le vieillissement ? Pourquoi les animaux meurent-ils ? Comment réconcilier l'édification d'un organisme à partir d'un œuf avec la tendance à la désorganisation à laquelle sont voués les systèmes complexes inanimés ? Comment expliquer la formation d'une aile, d'un œil, d'un rein, et la prodigieuse organisation que les progrès des méthodes d'observation révèlent jusqu'à l'échelle subcellulaire ?

Les meilleurs penseurs arrivaient à la conclusion que l'organisation des êtres vivants, la finalité évidente de leurs organes, le développement des embryons ne pouvaient pas s'expliquer par le jeu aveugle des atomes ; il fallait supposer l'existence d'une sorte d'anti-hasard propre à la vie, d'un «principe vital», mystérieux agent «immatériel» ou loi d'organisation encore inconnue.

Toutefois des recherches sur la constitution chimique des êtres, qui avaient commencé dès le milieu du XIX^e siècle, avaient mis en évidence des substances bien définies : urée, sucres, acides gras, acides aminés, montrant que les êtres vivants sont faits de molécules et pas d'une mystérieuse substance polymorphe échappant à l'analyse. C'est de cette «chimie organique» et de la physiologie qu'est issue la «biochimie» qui ne prit son essor qu'au XX^e siècle ; elle montra que sous la diversité des êtres se cache une profonde unité de constitution et que les mêmes mécanismes biochimiques sont communs à tous, bactéries, plantes et animaux, à des variantes près. Dès lors, c'est la grande unité du monde vivant qui devint fascinante bien plus que sa diversité.

La découverte des enzymes et l'étude de leur activité in vitro dans des systèmes très simples conduisirent les biochimistes à analyser laborieusement, détail par détail, la chimie des cellules. Ils s'appuyaient dans ces recherches sur les bases solides de la physique et de la chimie et progressaient avec sûreté. Allant du simple au complexe, des réactions individuelles aux ensembles coordonnés de réactions, ils découvraient peu à peu la signification biologique de cette chimie. Par exemple, lorsque les étapes de la fermentation alcoolique et de la glycolyse lactique eurent été établies, on comprit bientôt le principe des réactions couplées par lesquelles les cellules gardent en réserve une partie de l'énergie libre de la dégradation contrôlée des sucres ; quelques années plus tard, on comprenait comment elles utilisent cette énergie dans des synthèses chimiques ou pour accomplir des travaux mécaniques ou osmotiques. La découverte de l'ubiquité des acides nucléiques et de leur implication dans la synthèse des protéines,

l'établissement de la structure des acides nucléiques et des protéines furent des étapes essentielles.

Ces succès renforçaient la conviction que l'approche réductionniste, qui s'efforce d'expliquer des phénomènes complexes par des événements plus simples sous-jacents, était féconde en biologie comme en physique, et que la vie pourrait être expliquée par la structure et les interactions des molécules.

Une évolution comparable des idées se produisait d'ailleurs en génétique. Jusqu'aux années 30, les caractères héréditaires qui avaient fait l'objet des études les plus poussées étaient des caractères morphologiques : par exemple, la forme ou la longueur des ailes de la *Drosophile*, le dessin des nervures de ces ailes, ou la forme des yeux, c'est-à-dire des caractères résultant du développement très complexe de la mouche. L'étude de caractères reflétant directement des propriétés moléculaires – pigments, activités enzymatiques – et le choix d'organismes plus simples, moisissures, levures, bactéries, bactériophages, allaient montrer que des caractères biochimiques précis sont héréditaires et révéler les bases moléculaires de l'hérédité.

La découverte majeure qui en résulta fut l'identification de l'antihazard biologique. Car l'agent organisateur dont l'existence avait été soupçonnée par les philosophes existe bel et bien ; c'est *l'information génétique* que toute cellule a reçue de la cellule qui l'a engendrée et qu'elle transmettra à ses descendants. C'est une banque de données et un programme dont le support matériel est l'acide désoxyribonucléique (en abrégé ADN ou DNA). Les molécules d'ADN sont des chaînes de quelques milliers à quelques millions de maillons. Il y a quatre espèces de maillons, et *l'arrangement* de ceux-ci dans les chaînes a une signification, constitue un langage porteur d'information. Le texte génétique contient notamment les plans de tous les acides nucléiques et de toutes les protéines de l'organisme, ainsi que des programmes d'exécution et divers signaux qui coordonnent le tout et règlent les réactions de l'organisme aux changements du milieu extérieur.

Une cellule vivante est donc une prodigieuse machine moléculaire automatique, munie d'un programme, et dont toute l'activité résulte de l'exécution de celui-ci. Les protéines s'édifient conformément au programme et s'intègrent immédiatement à la machine dont elles sont les principaux rouages. Certaines d'entr'elles s'associent en organites plus complexes ; cette association est automatique, elle résulte de leur structure, de leurs propriétés géométriques et physiques ; d'autres

protéines, douées d'activité enzymatique dirigent la synthèse de molécules diverses, par exemple les phospholipides qui s'associent spontanément en formant les membranes ; d'autres font partie des systèmes qui catalysent la dégradation des sucres et qui récupèrent l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule.

Nous comprenons bien les principes du fonctionnement d'une cellule procaryote (une bactérie, par exemple), la coordination de ses activités, sa multiplication ; à condition d'admettre l'information génétique comme donnée, tout en découle logiquement, tout s'explique.

Les cellules eucaryotes, c'est-à-dire celles qui ont un noyau bien séparé du cytoplasme par une membrane, sont plus compliquées que les bactéries. Leur chimie est pratiquement identique, mais il y a des complications liées à l'existence du noyau, de la chromatine contenant l'ADN associé à des protéines, à la condensation de celle-ci en chromosomes, à l'appareil mitotique, à l'existence des mitochondries qui possèdent un peu d'ADN indépendant de celui du noyau. La régulation des activités enzymatiques est plus complexe que chez les bactéries, l'étude de leur génétique est beaucoup plus difficile et, par conséquent, moins avancée que pour les bactéries. Mais il est bien établi que les principes de l'expression de l'information génétique sont les mêmes que chez les procaryotes, quoique les mécanismes puissent différer.

Les organismes supérieurs sont d'immenses sociétés de cellules eucaryotes (Un homme est fait de cent mille milliards de cellules). Toutes dérivent d'une cellule unique, l'œuf fécondé, par divisions successives, différenciation, mouvements morphogénétiques. Nous ne comprenons pas encore les mécanismes de la différenciation et du développement embryonnaire, mais l'étude des interactions de cellules, l'expérimentation sur les premiers stades du développement, sur les relations du noyau et du cytoplasme, l'étude de mutants présentant des anomalies morphogénétiques, tout ce que nous savons à présent concourt à montrer que le développement embryonnaire s'explique aussi par l'exécution du programme génétique. Le déterminisme impliqué est extrêmement complexe car les résultats immédiats de l'action des gènes (formation de protéines particulières) ont des conséquences indirectes sur les propriétés des cellules et sur les interactions de celles-ci. Or, ces interactions déclenchent ou répriment à leur tour l'activité de certains gènes. L'intrication extrême des cascades

d'interactions fait que nous sommes très loin de démêler toutes les séries causales entrecroisées et d'expliquer en détails le développement ; mais il est clair qu'il est déterminé génétiquement ; il n'est affecté ou modulé sous l'action du milieu que dans des limites très étroites.

A l'heure actuelle, l'information génétique doit être considérée comme une donnée objective. Nous n'avons pas de théorie satisfaisante pour en expliquer l'apparition. Mais le problème de l'antihazard biologique, de nébuleux qu'il était il y a trente ans, s'est précisé : c'est une affaire de structures moléculaires, d'ordonnance de molécules ; c'est donc dans les propriétés des atomes et des molécules que nous devons en chercher l'origine, qui se confond avec l'origine de la vie.

L'étude des fossiles montre que des êtres vivants fonctionnant comme ceux que nous connaissons aujourd'hui peuplaient déjà la terre ou les mers il y a au moins six cent millions d'années. C'est donc avant cela que la vie avec son système d'information est apparue ; or, toute trace de ce qui a pu se passer alors a probablement disparu : les êtres vivants eux-mêmes ont fait disparaître les systèmes prébiotiques. Alors que les astro-physiciens reçoivent encore des messages de mondes qui se formaient il y a des millions d'années, et même de la grande explosion des premiers instants de l'univers, nous ne pouvons compter que sur nos connaissances de physique, de chimie et de biologie, et sur notre imagination. Nous entrevoyons déjà des bribes de solution, aussi peut-on espérer qu'une théorie vraiment satisfaisante de l'apparition de la vie émergera bientôt.

Il est bien établi que de nombreuses molécules organiques se forment dans l'univers, en l'absence d'êtres vivants ; il en apparaît même dans les espaces intersidéraux. On imagine donc que des cycles de réactions ont pu s'établir entre de telles substances aux premiers âges de la terre, qu'ils ont permis l'accumulation de substances douées, par hasard, d'activités catalytiques qui auraient provoqué des réactions plus complexes avec une efficacité accrue ; on pense à la structuration spontanée de systèmes chimiques, à l'apparition de «structures dissipatives» qui conféreraient une permanence spatiale et temporelle à certains systèmes dynamiques particuliers et pourraient créer des sortes de micro-climats ou de niches écologiques particulières pour des molécules. Mais il est raisonnable de situer la limite entre les systèmes prébiotiques et les premiers êtres vivants à l'apparition d'un mécanisme rudimentaire d'information, à la fois mémoire et programme ; cette «invention» a dû conférer à un tel système une capacité d'expansion et d'invasion exceptionnelle.

Si nous ne voyons pas clairement comment tout cela a commencé, nous comprenons par contre assez bien certains des mécanismes par lesquels l'information génétique de l'ADN, telle que nous la connaissons, a pu et peut encore évoluer par mutation, transposition, insertion et s'accroître par duplication de certaines régions de l'ADN ; nous trouvons des traces très claires de tels événements dans la structure des protéines et des acides nucléiques actuels. Ceux de ces accidents qui sont nuisibles sont sans conséquence car l'être qui en est victime disparaît sans laisser de descendance ou bien ses descendants sont éliminés dans la lutte pour la survie et la multiplication ; des accidents qui n'ont pas de conséquence fâcheuse contribuent à la diversification des espèces ; d'autres enfin peuvent conférer un avantage relatif et favoriser la prolifération des organismes chez lesquels ils se sont produits. Ces mécanismes de type «néodarwinien» sont provoqués et mis à profit journallement au laboratoire pour obtenir des souches de microorganismes ayant des propriétés décidées d'avance. Il est raisonnable de penser qu'ils sont parmi les mécanismes de l'évolution.

La Biologie moléculaire analyse les bases moléculaires des processus les plus fondamentaux de la vie ; elle s'inscrit dans le prolongement de la Physique et de la Chimie et nous propose une image cohérente et rationnelle du monde vivant. Elle est pour la compréhension de la matière vivante ce que la Physique quantique est pour celle de la matière inanimée. Sans doute le xx^e siècle restera-t-il dans l'histoire des sciences celui où les scientifiques ont réussi à englober dans une merveilleuse synthèse tous les phénomènes et tous les objets de l'univers, des ondes-particules aux êtres vivants les plus complexes.

Comme toute science nouvelle, la Biologie moléculaire nous donne des pouvoirs nouveaux.

Le langage de l'information génétique a été déchiffré en grande partie. Nous pouvons le lire. Il est le même, à quelques détails près, chez tous les organismes, microbes, animaux et plantes. Nous pouvons aussi l'écrire, c'est-à-dire fabriquer de toutes pièces de l'ADN dont les quatre maillons sont arrangés selon notre choix. Nous pouvons introduire dans des cellules vivantes cet ADN porteur d'une information écrite par nous dans le langage auquel elles obéissent. Nous pouvons donc ajouter nos instructions à celles que les cellules possédaient, et modifier ainsi leur fonctionnement à notre gré.

Ce «génie génétique» n'en est qu'aux premiers balbutiements ; il offre des possibilités inespérées à la recherche fondamentale notamment pour l'analyse moléculaire du développement embryonnaire, du système immunitaire et de la cancérisation. Il ouvre aussi la voie à de nombreuses applications industrielles : dès à présent des bactéries, reprogrammées à l'aide d'ADN synthétisé in vitro, produisent effectivement des protéines humaines utiles en thérapeutique, qui seront bientôt mises sur le marché : insuline, hormone de croissance, divers interférons. Sans doute parviendra-t-on à modifier des plantes de façon qu'elles puissent se passer d'engrais azotés ou qu'elles produisent des graines d'une meilleure valeur nutritive.

Notre maîtrise des mécanismes de la vie s'accroît aussi en ce moment grâce aux progrès réalisés dans la manipulation des cellules et des embryons. Transplantation de noyaux, fusion de cellules, création d'hybridomes, fécondation in vitro, implantation d'embryons, tri de cellules d'une population complexe comme celle des leucocytes, isolement de chromosomes ouvrent d'immenses possibilités à la découverte et à la maîtrise des mécanismes de la vie.

Ce que nous pouvons faire aujourd'hui était imprévisible il y a moins de dix ans. Les applications futures de la biologie moléculaire, de la génétique, de la manipulation des cellules vivantes sont aussi imprévisibles aujourd'hui que le développement des minuscules circuits intégrés et leurs possibilités infinies l'étaient lorsque les premiers transistors furent créés il y a trente ans. Nous sommes en tout cas témoins de l'éclosion de technologies biologiques dont on peut vraiment attendre des miracles.

L'espoir que font naître la biotechnologie et le génie génétique en particulier, leur succès même, risquent de faire croire que tout est compris, qu'il n'y a plus qu'à appliquer les connaissances et à en tirer profit. Ce serait une grave illusion ; c'est dans les pays qui sauront promouvoir une recherche fondamentale de premier plan que les vrais progrès se feront, et pas dans ceux qui n'auront à l'esprit que de tirer petitement des profits médiocres d'applications faciles. Les promesses et les gages d'avenir, c'est la recherche fondamentale qui les détient ; l'aventure de la biologie moléculaire en est un bel exemple ; elle n'en est pourtant qu'au début de son épanouissement.

CHAPITRE II

QUELQUES ÉLÉMENTS DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Pour bien comprendre l'idée que nous faisons à présent des mécanismes moléculaires d'une cellule vivante, il faut connaître – au moins dans leurs principes – la structure des protéines et des acides nucléiques. Nous les décrirons donc très schématiquement.

Les protéines.

Les protéines sont des macromolécules c'est-à-dire des assemblages parfaitement définis de très nombreux atomes (2.000 à 100.000 atomes selon la protéine considérée). Elles jouent dans les cellules les rôles les plus divers, par exemple certaines sont douées de propriétés catalytiques, ce sont les enzymes, d'autres forment des fibres constituant le squelette de la cellule, d'autres des structures de protection, d'autres servent de réserves alimentaires, d'autres encore s'associent en organites, en appareils très compliqués. La laine, le constituant principal du blanc d'œuf, l'hémoglobine rouge du sang, le gluten du blé sont des protéines.

Aussi diverses soient-elles, les protéines sont toutes bâties selon un même principe très simple : ce sont des chaînes linéaires d'acides aminés liés l'un à l'autre par la condensation du groupe carboxyle de l'un avec le groupe amine du suivant. La chaîne est plus ou moins longue selon la protéine considérée (50 acides aminés pour de petites protéines, plus de 1.000 pour les grosses). Il y a 20 espèces d'acides aminés qui diffèrent par la chaîne latérale R. Chaque protéine correspond à un arrangement particulier de ces 20 acides aminés mais cet arrangement semble arbitraire : la comparaison de très nombreuses protéines analysées jusqu'ici ne révèle aucune règle de séquence ; on ignore tout de l'ordre des acides aminés avant d'avoir laborieusement analysé la protéine d'un bout à l'autre.

Dans ces chaînes, deux liaisons par acide aminé ont le caractère de «liaisons simples». On peut se représenter une telle liaison comme un axe très court unissant deux atomes et sur lequel ils peuvent pivoter. Or les quatre liaisons d'un atome de carbone sont disposées dans une géométrie bien définie ; dans le cas le plus simple, elles forment entr'elles des angles de 109°. Quand un atome de carbone pivote sur

une des liaisons, la direction des trois autres change donc. Il en résulte que par rotation sur chaque liaison simple la chaîne d'acides aminés pourrait prendre une infinité de conformations différentes dans l'espace. En réalité les chaînes des protéines naturelles adoptent spontanément une conformation unique, très compacte, qui diffère d'une protéine à l'autre et qui ne dépend que de la séquence des acides aminés. Le repliement spontané des chaînes s'explique en ordre principal par l'«effet hydrophobe», tendance de la molécule à se pelotonner de la manière qui réduit autant que possible sa surface de contact avec l'eau ; cela correspond au maximum d'entropie du système protéine-eau.

Lorsque la chaîne se pelotonne, des interactions secondaires s'établissent entre ses différentes parties, selon la nature des atomes amenés au voisinage l'un de l'autre : des ponts d'hydrogène, des interactions dipolaires ou ioniques, des forces de van der Waals stabilisent l'édifice. La conformation finalement adoptée par la chaîne est un compromis entre ces nombreuses «liaisons secondaires» faibles, l'effet hydrophobe et les contraintes géométriques ; elle correspond à l'état d'énergie minimum du système protéine-eau.

La structure tridimensionnelle d'une protéine est donc déterminée par la séquence des acides aminés, mais par un déterminisme très complexe dans lequel de nombreuses forces se conjuguent . C'est une structure d'équilibre bien définie, qui laisse cependant à l'édifice une assez grande flexibilité.

Ce qui importe pour la fonction biologique d'une protéine c'est cette structure tridimensionnelle, la disposition relative des parties formant un objet moléculaire bien structuré mais cependant déformable, et doué de propriétés remarquables dont nous donnerons deux exemples.

a. Les Enzymes.

La «technologie» des réactions chimiques qui se produisent dans les cellules vivantes est fondamentalement différente de celle du laboratoire de chimie.

Au laboratoire, pour faire réagir deux produits chimiques, on les dissout généralement dans un solvant adéquat et on chauffe ; les molécules des deux réactifs se cognent au hasard de l'agitation thermique et certains de ces chocs sont suivis de la réaction cherchée, ou bien de réactions parasites.

Dans les réactions biochimiques, il en va tout autrement ; toutes sont catalysées par des enzymes, qui sont des protéines. Une enzyme forme sélectivement un complexe avec les molécules dont elle catalyse la réaction. Dans ce complexe, les molécules sont orientées de manière bien précise, dans la position qu'exige la réaction ; d'autre part la formation du complexe entraîne un changement de conformation de l'enzyme qui met en place les éléments de la machine catalytique, rapproche les réactifs et provoque la réaction.

La formation du complexe et la transconformation de l'enzyme ne sont correctes qu'avec les réactifs qui sont ses «substrats» physiologiques ; c'est pourquoi les réactions biochimiques ne produisent pas de produits secondaires ; leur rendement est quantitatif. Les enzymes sont de véritables appareils à faire réagir sélectivement d'autres molécules.

Ce sont en outre des catalyseurs réglables. Par exemple telle enzyme dont la fonction est de faire réagir les molécules A avec les molécules B peut être inactivée réversiblement par une molécule Y qui se fixe sur l'enzyme à un autre endroit que les molécules A et B, mais qui par sa fixation déforme l'enzyme et empêche la mise en place correcte de la machine catalytique. Dans d'autres cas, la fixation de Y pourra être une condition de l'activité de l'enzyme. Dans l'exemple que nous venons de donner, A et B sont les «substrats» de l'enzyme, Y est un «effecteur allostérique», (inhibiteur ou activateur).

Le réglage de l'activité des enzymes par des effecteurs allostériques est un des mécanismes cybernétiques assurant l'autorégulation des réactions biochimiques. Considérons, par exemple, la synthèse d'une substance S exigeant dix étapes successives catalysées chacune par une enzyme spécifique. La première enzyme de la série est souvent constituée de telle sorte qu'elle est inhibée par le produit final S de la chaîne de synthèse. Ce dispositif règle automatiquement la concentration de la substance S puisque sa synthèse s'arrête dès que sa concentration atteint la valeur adéquate pour inhiber la première enzyme.

Un mécanisme semblable permet également la coordination de chaînes de réactions n'ayant aucun élément commun, mais dont l'opération concertée est indispensable au bon fonctionnement de la cellule vivante.

b. Autoassemblage d'organites.

Certaines protéines s'assemblent en organites complexes. Cet assemblage est automatique, il résulte des propriétés structurales des

protéines impliquées. Par exemple, les flagelles des bactéries sont formés par l'association de nombreuses molécules d'une protéine, la flagelline. Ces molécules globulaires sont disposées dans le flagelle en cinq piles parallèles associées par des liaisons secondaires. La flagelline, lorsqu'elle se forme, est soluble, et une solution de flagelline laissée à elle seule ne forme pas de flagelles. Mais si on y introduit un morceau de flagelle, des molécules de flagelline soluble se fixent à l'une des extrémités et subissent une transconformation qui stabilise leur association avec le morceau de flagelle préexistant et leur confère la propriété de servir à leur tour d'amorce pour la fixation de nouvelles molécules de flagelline.

Des organites beaucoup plus complexes, formés de plusieurs espèces de protéines s'édifient selon le même principe ; c'est le cas des ribosomes qui contiennent une cinquantaine de protéines différentes, ou de l'enveloppe d'un bactériophage, par exemple. Dans l'autoassemblage de tels édifices supramoléculaires, le principe est toujours le même : l'ensemble des protéines *a*, *b*, *c*, *d*, etc. ... qui constitueront l'organite se forment séparément et la plupart d'entr'elles peuvent coexister dans la même solution sans interagir. L'édification de l'organite est amorcée par la fixation sur la protéine *a* d'une molécule *m* (petite ou grosse selon les cas) qui provoque un changement de conformation de la protéine *a*. Or, la protéine *b* a une grande affinité pour cette nouvelle conformation de *a* ; un complexe *ab* se forme donc rapidement. Mais la protéine *c* qui n'avait aucune affinité ni pour *a* ni pour *b* isolément, se fixe énergiquement sur le complexe *ab* en formant un nouveau complexe *abc* qui fixera sélectivement *d*, et ainsi de suite.

C'est de cette façon que des organites très complexes à structure parfaitement définie s'édifient par une suite univoque d'associations de molécules dont chacune détermine la suivante ; cette cascade d'opérations est une conséquence immédiate des propriétés structurales des protéines impliquées et des changements de conformation résultant de leurs interactions successives. L'organite semble ainsi s'édifier conformément à un programme.

Propriétés catalytiques des enzymes, autoassemblage d'organites protéiques complexes sont des conséquences de la structure tridimensionnelle bien définie mais déformable des protéines. Or cette structure, nous l'avons dit plus haut, résulte par un déterminisme très complexe de l'arrangement des acides aminés de vingt espèces dans les chaînes linéaires qui constituent les protéines.

Demandons-nous combien de chaînes différentes de 100 acides aminés il est concevable de construire à partir des 20 espèces d'acides aminés. Il y a 20 possibilités pour le premier acide aminé de la chaîne, 20 pour le second, donc $20 \times 20 = 400$ pour l'ensemble des deux premiers ; il y a $20 \times 20 \times 20 = 8000$ arrangements possibles pour le groupe des trois premiers, etc... donc 20^{100} séquences différentes possibles de 100 acides aminés. C'est un nombre inimaginablement grand : 20^{100} c'est à peu près 10^{130} ; on mesurera l'énormité de ce nombre en se souvenant que le nombre de protons dans l'univers entier est estimé à 10^{78} . Cela montre deux choses : d'une part que le principe sur lequel sont constituées les protéines offre des possibilités sans limites, et d'autre part qu'il n'y a pas assez de matière dans l'univers pour faire ne fût-ce qu'une seule molécule de chacune des chaînes protéiques imaginables de 100 acides aminés. Que dire d'une protéine de mille acides aminés comme par exemple l'une des enzymes impliquées dans la réplication du matériel génétique !

Les protéines réelles, celles qui existent dans la nature ne représentent qu'une fraction infime de l'immensité des séquences possibles. Chacun des arrangements existants est infiniment improbable ; si on provoquait la condensation au hasard des vingt acides aminés, fût-ce dans un volume aussi gros que la terre, on n'aurait guère de chance de former une seule molécule d'une de nos protéines. Pourtant, dans chacune des cellules de tout être vivant s'édifient à des milliers d'exemplaires quelques milliers d'espèces protéiques bien définies, quelques milliers d'arrangements d'acides aminés tout à fait improbables selon les lois du hasard. Ce prodige s'accomplit grâce à l'anti-hasard biologique, à l'*information génétique* inscrite dans les molécules d'acide désoxyribo-nucléique (ADN).

Nous verrons comment les protéines s'édifient après avoir examiné la structure et quelques propriétés des acides nucléiques.

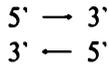
LES ACIDES NUCLÉIQUES

La charpente d'un acide nucléique est une longue chaîne de nombreuses molécules d'acide phosphorique et de sucre alternant régulièrement. Dans les acides ribo-nucléiques (ARN, RNA) le sucre est le ribose, dans les acides désoxyribo-nucléiques (ADN, DNA) c'est du désoxyribose. Cette charpente est orientée comme un vecteur car

chaque reste de sucre est lié par le carbone 5' au reste d'acide phosphorique qui le précède et par le carbone 3' à celui qui le suit.

Sur le premier carbone de chaque résidu de sucre est attachée une des bases hétérocycliques suivantes : Adénine, Guanine, Cytosine et Uracile pour les ARN, et pour les ADN les mêmes bases sauf que l'Uracile est remplacée par la Thymine.

Une molécule d'ADN est formée de deux chaînes de ce type ; elles sont antiparallèles



et enroulées l'une autour de l'autre en hélice à la façon des torons d'une ficelle ; c'est la «double hélice».

Les bases sont disposées à l'intérieur de l'hélice, presque perpendiculairement à l'axe de celle-ci. En face d'une Adénine dans une des chaînes se trouve toujours une Thymine dans l'autre, et en face d'une Guanine une Cytosine, c'est pourquoi on parle souvent des «paires de bases». Les séquences des bases des deux chaînes sont donc complémentaires et antiparallèles. Les bases appariées sont unies par des ponts d'hydrogène, deux pour la paire AT, trois pour la paire GC. La structure en double hélice de l'ADN dépend de la sélectivité de ces liaisons entre bases complémentaires, mais elle est stabilisée par les forces d'empilement (interactions π) des paires de bases successives.

Chimiquement, les chaînes d'ADN sont très résistantes : il faut appliquer des traitements très drastiques pour les briser et les décomposer, par exemple un chauffage prolongé dans un acide très concentré. Mais la structure en double hélice peut s'effondrer à la suite de traitements beaucoup moins brutaux, et les deux chaînes peuvent se séparer sans être brisées. Par exemple, lorsqu'on chauffe une solution aqueuse neutre d'ADN vers 90°, les ponts d'hydrogène entre bases et les liaisons π d'empilement se rompent et les deux chaînes se séparent sans subir aucun dommage ; seule leur association est rompue. On dit que l'ADN est «dénaturé» (*). Si la solution est refroidie très progressivement, les séquences complémentaires de bases se retrouvent, les paires A = T et G \equiv C se reforment, les deux chaînes se réassocient parfaitement. La complémentarité des séquences est une

(*) Ce phénomène fut découvert par notre collègue R. Thomas alors que, tout jeune chercheur, il préparait une thèse de doctorat dans le laboratoire du professeur J. Brachet, à l'U.L.B.

condition nécessaire à la formation correcte d'une double hélice. Les ADN de tous les organismes ont la même structure générale, mais ils diffèrent par la séquence des quatre paires de bases le long de la double hélice. Cet arrangement constitue un texte porteur d'information qui régit toute la structure et tout le fonctionnement de la cellule et de l'organisme.

Réplication de l'ADN.

Lorsqu'une cellule se divise, chaque cellule fille reçoit une copie complète de l'information génétique de la cellule mère. L'information doit donc être recopiée, c'est-à-dire que de l'ADN nouveau doit être synthétisé en respectant rigoureusement la séquence des paires de bases de l'ADN de la cellule mère car c'est cette séquence qui porte l'information génétique.

Puisque l'ADN est formé de deux chaînes dont les séquences de bases sont complémentaires, il porte l'information en double exemplaire ; si on connaît la séquence d'une des chaînes, on peut en déduire immédiatement celle de l'autre chaîne. La «réplication» de l'ADN repose sur ce fait. On peut la décrire superficiellement de la manière suivante : les deux chaînes de l'ADN se séparent localement, les molécules des précurseurs fournissant les maillons qui formeront les nouvelles chaînes sont sélectionnées par chaque chaîne existante, un A se plaçant en face d'un T, etc. ... les maillons mis en ordre s'accrochent, une nouvelle chaîne complémentaire s'édifie au contact de chacune des deux chaînes de la molécule mère. Il en résulte qu'au lieu d'une double hélice d'ADN on obtient deux doubles hélices identiques toutes les deux à la molécule maternelle, chaque double hélice fille étant formée d'une des chaînes de la molécule mère et d'une chaîne complémentaire toute neuve. On dit que la réplication est «semi-conservative».

En réalité, le mécanisme moléculaire de cette réplication est beaucoup plus compliqué que ce schéma pourrait le faire croire. Dans le cas simple des bactéries, la réplication de l'ADN exige la collaboration d'au moins 12 protéines différentes, les unes douées d'activités enzymatiques, les autres ayant pour fonction de résoudre les problèmes topologiques et énergétiques difficiles posés par l'ouverture de la double hélice, son déroulement local, la nécessité de couper une chaîne tous les dix chaînons environ et de lui permettre de pivoter, puis de la resouder. Pour apprécier la complexité de l'opération, il faut

savoir aussi que dans une bactérie d'un micron de diamètre se trouve une double hélice d'ADN refermée sur elle-même, circulaire, d'une longueur (circonférence) de 1 millimètre, c'est-à-dire mille fois la dimension de la bactérie dans laquelle elle se trouve. Cette molécule en double hélice commence à se répliquer en un point précis ; la réplication progresse simultanément dans les deux directions et donne naissance finalement à deux cercles en double hélice de 1 mm de circonférence qui vont chacun dans une des cellules filles sans s'emmêler. La vitesse de l'opération exige qu'à chacune des deux fourches de réplication les molécules en formation tournent à 5000 tours par minute.

Toute erreur de réplication changerait l'information génétique de l'organisme, causerait une mutation. La fidélité du système de réplication proprement dit est remarquable, il ne commet guère plus d'une erreur pour un million de chaînons nouveaux mis en place. Il existe en outre plusieurs mécanismes de correction capables de détecter la plupart des rares erreurs commises à la réplication et de les corriger, si bien que le taux d'erreur final ne dépasse guère une erreur sur 10^{11} (cent mille millions) de chaînons. L'information génétique est ainsi très bien conservée à travers les générations.

Des accidents peuvent affecter l'ADN : des agents «mutagènes» chimiques ou physiques (radiations) peuvent modifier ou détruire des bases, ou encore briser les chaînes. Certaines de ces lésions peuvent être palliées par des «systèmes de réparation» qui tirent parti de ce que l'information est conservée dans chacune des deux chaînes complémentaires ; si l'une des deux est abîmée, elle peut être réparée correctement grâce à l'information contenue dans l'autre. Il existe aussi des systèmes de sauvetage plus subtils dont la description n'a pas sa place dans la présente esquisse (*).

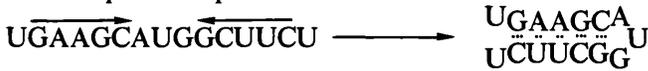
Si la règle est que l'ADN se réplique *ne varietur* sauf accident, il peut cependant subir divers remaniements dont l'intérêt biologique est fondamental. Par exemple, en plus de son matériel génétique, la bactérie peut héberger des molécules circulaires d'ADN beaucoup plus petites, les épisomes ou plasmides qui peuvent se multiplier indépendamment mais dont certains peuvent occasionnellement s'intégrer à l'ADN principal. On connaît depuis peu toute une collection d'ADN particuliers, les insertosomes, les transposons, qui peuvent faire partie

(*) L'un d'eux fut découvert et analysé par M. Radman à l'U.L.B. Voir Titre III.

de l'ADN du génome ou s'y intégrer, provoquer des mutations ou des déplacements de morceaux d'ADN, avec des conséquences diverses. Certains virus cancérogènes, des virus de leucémie notamment sont apparentés aux insertosomes. Des remaniements des ADN sont impliqués aussi dans la création de l'étonnante diversité des anticorps, ils accompagnent l'expression de l'information de certains gènes (*) ; ils jouent peut-être un rôle dans le développement embryonnaire.

Les Acides Ribonucléiques (ARN, RNA).

Chimiquement, les ARN ne diffèrent des ADN que par le sucre qu'ils contiennent (ribose au lieu de désoxyribose) et par la présence d'uracile au lieu de thymine parmi les bases. Contrairement aux ADN, leur molécule est presque toujours formée d'une seule chaîne. Toutefois, dans la plupart d'entr'eux, il y a, de place en place le long de l'unique chaîne, des séquences antiparallèles de bases complémentaires, comme ceci par exemple :



et la molécule en se repliant sur elle-même peut former localement une double hélice comparable à celle d'un ADN, mais souvent fermée à une extrémité par une boucle, ou bien formée par l'association de deux séquences complémentaires qui se trouvent très loin l'une de l'autre dans la chaîne. De même que les chaînes d'acides aminés des protéines se pelotonent et adoptent spontanément une structure d'énergie minimum déterminée par de nombreuses interactions, de même les chaînes de nucléotides des ARN se replient sur elles-mêmes et adoptent spontanément une conformation d'énergie minimum qui est réalisée – en première approximation – lorsque le plus grand nombre possible d'appariements de bases complémentaires se sont établis. La conformation des ARN, comme celle des protéines, est essentielle pour leur fonction.

La synthèse des ARN est catalysée par une enzyme, la «RNA polymérase» ; elle ne résulte pas de l'association au hasard des quatre éléments (nucléotides) qui les constituent ; l'ordre dans lequel ils s'enchaînent est imposé par l'arrangement des nucléotides de l'ADN.

(*) Voir les articles de MM. Steinert et Urbain dans le présent volume.

Tous les ARN sont des copies de segments d'ADN auxquels ils correspondent point par point. Puisque la séquence des nucléotides de l'ADN constitue un texte porteur d'information, et que les ARN sont des copies partielles de cette séquence, on peut dire qu'une partie de l'information de l'ADN est transcrite dans un langage à peine différent lorsque des ARN sont synthétisés. C'est pourquoi la synthèse des ARN est souvent dénommée «transcription».

Tout l'ADN d'une bactérie ou d'une cellule supérieure n'est pas transcrit continuellement d'un bout à l'autre en ARN. Il faut distinguer sur l'ADN des unités de transcription, des régions de l'ADN qui sont transcrites en une fois et dont la transcription est réglée par divers mécanismes dont nous donnerons un exemple plus loin. Ces unités de transcription sont généralement appelées «opérons». Au début d'un opéron se trouvent des séquences de bases de l'ADN qui sont presque palindromiques, c'est à dire qu'à ces endroits particuliers, les séquences de bases dans les deux chaînes sont presque identiques si on les lit en sens inverse, comme ceci par exemple :



La RNA polymérase qui catalyse la synthèse des ARN a une grande affinité pour de telles régions (dénommées «promoteurs») et s'y fixe ; sous son action, la double hélice d'ADN s'entr'ouvre et l'enzyme assemble une molécule d'ARN qui est une copie conforme de l'une des chaînes de l'ADN, à cela près que la thymine y est remplacée par l'Uracile.

Le processus de transcription est assez bien compris : les précurseurs, c'est à dire les éléments de construction de l'ARN sont les quatre «nucléoside-triphosphates» ATP, GTP, UTP, CTP. Le précurseur adéquat est sélectionné à chaque pas d'après sa capacité de s'apparier correctement avec la base de la chaîne l'ADN qui sert de modèle : en face de T, l'enzyme met A, en face de C, elle met G, etc. Après chaque opération, l'enzyme se déplace d'un cran et la chaîne d'ARN s'édifie pas à pas au contact de la molécule organisatrice d'ADN dont la double hélice s'entr'ouvre au passage de l'enzyme et se referme derrière elle. La synthèse d'ARN, la «transcription» se poursuit jusqu'à ce que l'enzyme rencontre une séquence particulière de bases que l'enzyme perçoit

comme un signal de fin de transcription et auquel elle obéit ; elle libère l'ARN et se détache elle-même de l'ADN.

Tous les ARN sont transcrits sur l'ADN. Ils se répartissent en trois classes principales : ARN ribosomiaux, ARN de transfert et ARN messagers ; ce sont des éléments essentiels du système qui fabrique les protéines, nous examinerons plus loin la fonction de chacune de ces classes d'ARN.

Le produit immédiat de transcription subit en général divers remaniements avant de s'intégrer dans les mécanismes cellulaires : les ARN ribosomiaux subissent quelques méthylations, les précurseurs des ARN de transfert voient plusieurs de leurs bases modifiées de diverses manières par des réactions enzymatiques, certaines séquences transcrites sont éliminées. Seuls les ARN messagers des procaryotes fonctionnent dans l'état où ils ont été transcrits. Ceux des eucaryotes résultent au contraire de profonds remaniements du produit de transcription.

Régulation de la transcription.

La transcription des ARN sur l'ADN est réglée par des mécanismes très subtils et assez divers. A titre d'exemple, nous considérerons le cas d'un messenger bactérien.

Un ARN messenger bactérien est le produit de transcription d'un opéron dans lequel est inscrite l'information qui détermine la séquence des acides aminés de quelques chaînes polypeptidiques. Tous les ARN messagers de toutes les protéines d'une bactérie ne sont pas produits continuellement ni au même rythme ; la transcription des messagers est très bien réglée. Chez les bactéries, les messagers ont la vie brève : ils sont détruits après quelques minutes ; la production d'une protéine dépend étroitement de la production soutenue du messenger correspondant.

Prenons l'exemple classique. Une bactérie, *Escherichia coli*, utilise bien le glucose pour croître ; elle ne possède pas de galactosidase, l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse du lactose, et ne peut donc pas utiliser ce sucre. Mais si le glucose vient à manquer *et* qu'il y ait du lactose dans le milieu (deux conditions nécessaires) la bactérie se met à fabriquer la galactosidase et acquiert ainsi la capacité de se nourrir de lactose. C'est un remarquable phénomène d'adaptation à un changement du milieu

extérieur. Il repose sur la régulation de la synthèse de l'ARN messager de la galactosidase ; il met en jeu un contrôle positif et un contrôle négatif, et peut se résumer comme suit :

Au début de l'opéron de la galactosidase, il n'y a pas de séquence pour laquelle la RNA polymérase ait une affinité ; elle ne se fixe donc pas dans cette région et l'opéron n'est pas transcrit. Mais si le glucose vient à manquer dans le milieu extérieur, de nombreuses réactions enzymatiques qui se produisaient dans la bactérie sont perturbées, et il apparaît notamment une substance qui n'était présente auparavant qu'à l'état de traces, l'acide adénylique cyclique (cAMP). Celui-ci se fixe sur une protéine dénommée CAP présente dans la bactérie ; en se fixant, il provoque un changement de conformation de cette protéine qui acquiert ainsi une très grande affinité pour la région promoteur qui précède immédiatement l'opéron de la galactosidase sur l'ADN. CAP chargé de cAMP s'y fixe donc sélectivement. Alors, et alors seulement, la polymérase des ARN peut se fixer sur l'ADN à côté de CAP au début de l'opéron. Elle pourrait transcrire celui-ci s'il n'y avait tout à côté une autre protéine, le «répresseur» fixé très énergiquement à l'ADN, qui bloque le mouvement de la RNA polymérase. Mais si du lactose est ajouté au milieu dans lequel se trouve la bactérie, quelques molécules de ce sucre pénètrent dans la bactérie et sont transformées en un isomère, l'allolactose. Celui-ci se fixe sur le répresseur, provoque un changement de conformation de cette protéine qui perd de ce fait toute affinité pour l'ADN et s'en détache ; dès lors la polymérase peut transcrire l'opéron.

Ainsi, en présence de glucose la transcription ne se fait pas parce qu'il n'y a pas formation de cAMP et qu'en absence de cette substance la protéine CAP ne se fixe pas, et par conséquent la RNA polymérase ne se fixe pas non plus. S'il n'y a pas de lactose, l'opéron n'est pas transcrit parce que le répresseur bloque l'entrée de l'opéron. Il faut que les deux conditions soient remplies : absence de glucose et présence de lactose pour que l'opéron soit transcrit en un messenger portant l'information qui détermine la séquence des acides aminés de la galactosidase, donc pour que cette enzyme soit produite.

Dans ce phénomène d'adaptation, le milieu extérieur n'a rien apporté d'autre que des signaux qui ont déclenché un mécanisme complexe programmé dans le matériel génétique.

Le Code génétique.

Nous avons dit plus haut que l'arrangement des bases le long des chaînes d'ADN constitue un langage porteur d'information. En réalité, il forme plusieurs langages parfois superposés et dont nous ne connaissons pas encore toutes les subtilités. Nous savons toutefois que certaines séquences sont des signaux «reconnus» par des protéines, comme la RNA polymérase, la protéine CAP, le répresseur dans les exemples que nous avons donnés. Mais la partie la plus remarquable sans doute de cette information est celle qui détermine la séquence des acides aminés lors de la synthèse des protéines.

Chaque acide aminé de chaque protéine est représenté dans l'ADN par une séquence de trois paires de bases contiguës, et dans l'ARN messenger transcrit sur cet ADN, par un triplet de bases (appelé «codon» parce qu'il représente, en code, l'acide aminé en question).

Chez les bactéries les codons se suivent dans l'ADN comme dans l'ARN messenger dans le même ordre que les acides aminés qu'ils représentent dans la protéine ; on dit que les deux séquences sont collinéaires. Chez les eucaryotes, la situation est plus compliquée : l'information codée dans le gène d'une protéine est généralement fragmentée, interrompue par des séquences non codantes, des «introns». Lors de la synthèse des messagers, le gène est transcrit entièrement, séquences codantes («exons») et séquences intercalaires («introns») comprises. La longue molécule d'ARN formée subit alors diverses modifications, parmi lesquelles une opération compliquée de découpage et raboutage qui a pour effet d'éliminer les introns et de former avec les exons un ARN messenger dans lequel la séquence des codons est parfaitement collinéaire de la séquence des acides aminés de la protéine dont il organisera la synthèse. Cette opération compliquée est généralement appelée «épissage», ou «splicing» en anglais.

La signification des codons est la même pour tous les êtres vivants, virus, bactéries, plantes et animaux ; il n'y a que quelques variantes mineures qui ne changent rien au principe essentiel : le code génétique est universel. Ce code – on devrait dire le lexique – est représenté sur la figure —. On voit que les 64 triplets qu'il est possible de former avec les quatre bases ont une signification et sont utilisés : 61 d'entr'eux désignent l'un des 20 acides aminés (la plupart des acides aminés peuvent en effet être représentés par plusieurs codons différents ; on dit pour cela que le code est «dégénéré»). Les trois autres codons (UAA,

UAG et UGA) généralement appelés codons non-sens parce qu'ils ne représentent aucun acide aminé, ont en réalité un sens bien précis : ils signifient fin de chaîne, terminaison. Dans la figure ci-dessous ils sont désignés respectivement par les termes anglais ochre, amber et opal auxquels il ne faut attribuer aucune signification particulière, leur origine est anecdotique.

Le Code Génétique

1st 2nd →	U	C	A	G	3rd
U	PHE PHE LEU LEU	SER SER SER SER	TYR TYR Ochre Amber	CYS CYS Opal TRP	U C A G
C	LEU LEU LEU LEU	PRO PRO PRO PRO	HIS HIS GLUN GLUN	ARG ARG ARG ARG	U C A G
A	ILEU ILEU ILEU MET	THR THR THR THR	ASPN ASPN LYS LYS	SER SER ARG ARG	U C A G
G	VAL VAL VAL VAL	ALA ALA ALA ALA	ASP ASP GLU GLU	GLY GLY GLY GLY	U C A G

La machine qui fait les protéines traduit la séquence des codons du messager en construisant la séquence correspondante d'acides aminés. Aussi, la synthèse des chaînes protéiques est-elle souvent appelée «traduction».

Traduction, Formation des chaînes polypeptidiques.

Le bâti de la machine qui fait les protéines, c'est le ribosome, édifice très complexe comprenant au total 55 protéines différentes et trois ARN ribosomaux chez les bactéries. Chez les eucaryotes le ribosome

est encore plus compliqué. Les cellules qui produisent beaucoup de protéines contiennent plus de ribosomes que celles qui sont moins actives ; c'est ce qui explique la corrélation existant entre activité des synthèses protéiques et abondance des ARN. Cette corrélation, découverte par J. Brachet à l'U.L.B. en 1941 fut la première indication de la participation des ARN dans la synthèse des protéines. Elle eut une profonde influence sur l'évolution des idées dans ce domaine.

Les ribosomes sont formés de deux particules qui peuvent se séparer et se réassocier dans des conditions bien définies. C'est à leur contact que l'information portée par un ARN messager est traduite, c'est là que les acides aminés sont sélectionnés et mis en ordre selon l'information apportée par le messager.

Les lecteurs du code sont les ARN de transfert, d'étonnantes molécules dont nous considérerons brièvement la structure. Il y a au moins soixante ARN de transfert différents dans une cellule. Chacun est formé d'une chaîne d'environ 80 nucléotides, dont plusieurs sont modifiés (c'est à dire qu'à côté des quatre nucléotides habituels dont les bases sont A,G,U,C, les ARN de transfert contiennent d'autres bases résultant de modifications enzymatiques opérées après la transcription). La chaîne des ARN de transfert contient toujours quatre paires de courtes séquences antiparallèles complémentaires deux à deux ; aussi se replie-t-elle sur elle-même en formant quatre courts segments en double hélice ; c'est ce qui apparaît dans la représentation habituelle de la structure des ARN de transfert sous forme d'une «feuille de trèfle». Cette image, sans être incorrecte, est trompeuse. En réalité, d'autres interactions à l'intérieur de la molécule confèrent finalement à la molécule la forme générale d'une équerre ou de la lettre L. A l'extrémité d'une des branches d'un ARN de transfert, est accroché un acide aminé. L'extrémité de l'autre branche est formée par une boucle contenant «l'anticodon» c'est à dire un triplet de nucléotides complémentaire d'un des codons qui symbolisent précisément l'acide aminé accroché à l'autre bout.

Cette congruence est tout à fait remarquable et mérite qu'on s'y arrête un instant. L'acide aminé a été accroché à l'ARN de transfert par une enzyme (aminoacyl-tRNA synthetase) ; il existe 20 enzymes de cette sorte, spécifiques chacune d'un des vingt acides aminés. Chacune de ces enzymes est donc capable de sélectionner d'une part l'acide aminé qui lui revient et d'autre part, parmi les quelques 60 ARN de transfert, ceux qui portent un anticodon complémentaire d'un des

codons de cet acide aminé. Il est assez curieux de constater que l'enzyme «reconnait» les RNA de transfert à des particularités de structure qui sont généralement indépendantes de l'anticodon qu'il porte.

C'est l'appariement de l'anticodon de l'ARN de transfert avec le codon du messenger au contact du ribosome qui sélectionne à chaque pas l'acide aminé qui doit être mis en place dans l'édification de la chaîne protéique. Voyons comment cela se fait chez les bactéries.

Dans l'ARN messenger transcrit sur l'ADN, la séquence codante est précédée et suivie de séquences qui ne seront pas traduites en protéine, mais qui comportent des signaux réglant l'opération de la machine : par exemple une séquence de bases requise pour la fixation correcte du messenger sur le ribosome, des signaux indiquant à la machine comment il faut décomposer la séquence en triplets (on dit généralement «déterminer la phase de lecture»); en effet, les 64 triplets ont une signification, chaque séquence pourrait donc être lue de trois façons différentes selon le point à partir duquel on compte les triplets. La mise en phase est assurée par un système complexe dans lequel interviennent des signaux qui changent la signification de certains codons placés après une séquence particulière et en font des codons de mise en phase et de démarrage de la lecture.

Si nous pouvions observer un ribosome au contact duquel une chaîne protéique est en construction, nous verrions ceci : l'ARN messenger est pincé entre les deux particules qui forment le ribosome, il a l'air de traverser celui-ci de part en part. La partie déjà faite de la protéine en construction émerge du ribosome et elle s'est déjà repliée spontanément. Nous voyons le messenger se déplacer par à-coups par rapport au ribosome tandis que la chaîne protéique s'allonge ; à chacun des à-coups l'ARN messenger avance de trois nucléotides et la protéine s'allonge d'un acide aminé.

Voyons maintenant ce qui se passe à l'intérieur du ribosome. Le morceau déjà fait de la protéine est accroché par son extrémité carboxylique à un ARN de transfert, celui du dernier acide aminé mis en place ; il se trouve en un endroit du ribosome appelé «site P». Au «site A» contigu se trouve immobilisé le codon de l'acide aminé qu'il faut maintenant ajouter à la chaîne pour continuer sa construction. De nombreux ARN de transfert se présentent et se bousculent jusqu'à ce qu'il s'en trouve un parmi eux qui possède un anticodon complémentaire du codon exposé au site A. Cet ARN se fixe au codon et amène

l'acide aminé qu'il porte au voisinage immédiat de l'extrémité de la chaîne protéique en construction. Une enzyme qui fait partie du ribosome et se trouve à cet endroit précis provoque la réaction qui unit le groupe amine de l'acide aminé au carboxyle de la chaîne déjà faite. Il en résulte que la chaîne protéique s'est allongée d'un maillon, mais elle est maintenant liée, par le dernier acide aminé qui vient d'être ajouté, à l'ARN de transfert de celui-ci, qui est toujours au site A. Alors se produit la «translocation» : l'ARN de transfert auquel la chaîne est accrochée glisse du site A au site P, entraînant avec lui le messenger qui avance ainsi de trois bases, ce qui amène au site A le codon suivant.

L'opération se répète cycliquement jusqu'à ce qu'apparaisse au site A un des codons dits «non-sens» qui signifient que la synthèse est terminée. Aucun ARN de transfert ne correspond à ces codons, mais ils sont détectés par des «facteurs de terminaison», protéines qui en leur présence se fixent sur l'enzyme qui catalysait précédemment l'union de l'acide aminé arrivant avec la chaîne déjà formée ; ils modifient cette enzyme de telle façon qu'elle catalyse cette fois la rupture de la liaison qui subsiste entre la chaîne terminée et le dernier ARN de transfert. La chaîne protéique libérée achève de se replier, prend spontanément sa place dans la bactérie et s'intègre à son fonctionnement. Quant au ribosome, il s'est dissocié en deux particules qui pourront accepter un nouveau messenger génétique et faire une autre chaîne protéique.

L'esquisse de la synthèse d'une protéine que nous venons de tracer est très schématique, elle en fait apparaître le principe seulement. Chaque étape de l'opération met en jeu des mécanismes moléculaires remarquables, indispensables d'ailleurs au fonctionnement correct de cette machine. Plusieurs des étapes se décomposent en réalité en une suite d'événements comparable à celle que nous avons décrite pour l'autoassemblage d'organites, et dans laquelle chaque étape est une condition de la suivante ; c'est le cas de la fixation du messenger au ribosome, de l'association des deux sous-unités ribosomales, de la fixation des ARN de transfert sur le codon, qui requièrent la participation de diverses protéines extérieures au ribosome.

Bien que le principe de la synthèse des protéines soit connu et ses mécanismes moléculaires partiellement analysés, il reste beaucoup à faire pour comprendre toutes les subtilités de cette mécanique. On trouvera dans le chapitre suivant quelques exemples de questions qui se posent actuellement dans ce domaine.

**

Mini-glossaire (*)

<i>activateur</i>	– voir gène de régulation.
<i>ADN</i>	– voir DNA
<i>ARN</i>	– voir RNA
<i>antiparallèle</i>	– les chaînes d'acides nucléiques ont une polarité. Deux chaînes associées dont les polarités sont opposées sont dites antiparallèles.
<i>bactériophages</i>	– (= phages). Les virus qui s'attaquent aux bactéries. Comme tous les virus, ils comportent un matériel génétique, généralement constitué d'une molécule de DNA ou de RNA, enveloppée dans une enveloppe ou une capsid.
<i>capsid</i>	– l'enveloppe d'un virus, formée dans les cas simples de l'assemblage de nombreuses molécules protéiques de peu de types différents, et comportant en outre des lipides dans les cas complexes.
<i>circulaire</i>	– se dit des molécules de DNA refermées sur elles-mêmes. «Circulaire» est pris ici dans son sens topologique : il est bien évident qu'une molécule de DNA de 2 mm de contour ne peut avoir la forme d'un cercle dans une cellule de 1 micron de long !
<i>clone</i>	– ensemble de cellules dérivées par divisions successives d'une cellule unique (Nous sommes tous des clones)
<i>complémentaires</i>	– voir <i>nucléotides</i> . La molécule de DNA en double hélice peut être comparée à une échelle (torsadée) dont les barreaux sont formés de l'association (par ponts d'hydrogène entre leurs bases azotées) de deux <i>nucléotides</i> , l'un appartenant à une fibre, l'autre à l'autre. Cette association requiert qu'à un nucléotide «dG» d'une fibre corresponde un nucléotide «dC» dans l'autre fibre, et à un nucléotide «dA» d'une fibre un nucléotide «dT» dans l'autre. Cette complémentarité est à la base du principe de la réplication. En effet, si on connaît la séquence d'une fibre, on connaît la séquence (complémentaire) de l'autre : chacune des deux fibres contient donc l'information nécessaire pour synthétiser l'autre.

(*) *Remarque* : les mots en italique dans le texte sont repris dans le glossaire.

<i>défectif</i>	– se dit de mutants, et notamment de mutants de virus, incapables de se développer parce que la mutation considérée inactive un gène essentiel.
<i>DNA (= ADN)</i>	– support matériel majeur de l'hérédité. Macromolécules généralement formées de deux fibres <i>complémentaires antiparallèles</i> (la célèbre double hélice de Watson et Crick). Chacune des fibres est un assemblage orienté de nombreux nucléotides qui sont les lettres de l'alphabet génétique.
<i>enzymes de restriction</i>	– endonucléases qui reconnaissent des séquences bien précises de DNA, souvent palindromiques. Voir <i>nucléases</i> .
<i>épigénétique</i>	– on parle de différence épigénétique pour désigner une différence entre deux lignées cellulaires, différence héréditaire mais non liée à une différence dans la séquence des nucléotides du génome. Dans les cas qui sont compris, il est clair qu'il s'agit d'états stationnaires multiples «à la Prigogine».
<i>eucaryotes</i>	– (par opposition aux procaryotes) : les organismes «supérieurs» (grenouille, tomate, homme, levure), dont les cellules comportent un noyau individualisé par une membrane nucléaire et des <i>mitochondries</i> .
<i>gènes précoces</i>	– les gènes d'un virus qui sont exprimés peu après l'infection ; c'est notamment le cas des gènes de régulation viraux et des gènes de réplication.
<i>gènes tardifs</i>	– les gènes d'un virus qui ne sont exprimés que tardivement ; c'est notamment le cas des gènes qui codent pour les constituants de la capsid (voir <i>virion</i>) et des gènes responsables de la lyse cellulaire
<i>gène de régulation</i>	– gène dont le produit (répresseur ou activateur) exerce un contrôle sur l'expression d'un ou plusieurs gènes (y compris éventuellement lui-même).
<i>génome</i>	– l'ensemble du matériel génétique d'une cellule ou d'un virus. Dans le cas d'une cellule eucaryote le génome est l'ensemble des chromosomes. Chez les bactéries le génome est constitué du chromosome principal (une molécule de DNA circulaire) et d'éventuels plasmides (petites molécules de DNA circulaire). Chez les virus, il se réduit généralement à une molécule de DNA ou de RNA.
<i>immunité</i>	– en dehors du sens courant, qui concerne les organismes supérieurs, ce terme s'applique aux bacté-

	ries <i>lysogènes</i> pour désigner leur insensibilité à l'infection par un <i>bactériophage</i> du même type que celui qu'elles véhiculent à l'état de <i>prophage</i> (voir <i>lysogène</i> , <i>prophage</i>).
<i>linéaire</i>	– se dit d'une molécule de DNA ouverte. «Linéaire» est pris ici dans un sens topologique (voir <i>circulaire</i>).
<i>lyse</i>	– éclatement d'une cellule avec libération de particules. La «réponse lytique» est la manière la plus courante pour une cellule de réagir à l'infection par un virus ; elle se caractérise par la multiplication du génome viral, la formation de nombreuses particules de virus et la lyse cellulaire.
<i>lysogène</i>	– se dit d'une bactérie qui a incorporé dans son matériel génétique celui d'un bactériophage tempéré.
<i>mitochondries</i>	– les organites responsables de la respiration cellulaire, source d'énergie principale des organismes incapables de photosynthèse
<i>nucléotides</i>	– les briques (ou plutôt les perles) dont sont faites les chaînes d'acides nucléiques. Il y en a 4 principaux, tant dans le RNA (A, G, C, U) que dans le DNA (dA, dG, dC, dT).
<i>nucléases</i>	– enzymes qui coupent les chaînes d'acides nucléiques. Les exonucléases débitent les chaînes en commençant par leurs extrémités. Les endonucléases font des coupures internes.
<i>oncogène</i>	– se dit des virus dont l'interaction avec une cellule peut être à l'origine d'un cancer.
<i>opérateur</i>	– séquence de DNA localisée à l'origine d'un <i>opéron</i> et reconnue par un <i>répresseur</i> spécifique ; la fixation du répresseur sur l'opérateur empêche la transcription de l'opéron.
<i>opéron</i>	– groupe de gènes adjacents transcrits en un RNA messenger commun.
<i>phage</i>	– voir <i>bactériophage</i> .
<i>plasmides</i>	– chimères entre un <i>bactériophage</i> et un <i>plasmide</i> (peuvent être obtenus par recombinaison <i>in vitro</i>).
<i>plasmides</i>	– petites molécules de DNA circulaire capables de réplication autonome. Exemple : le facteur sexuel des bactéries et de nombreux facteurs conférant des résistances à des antibiotiques.
<i>procaryotes</i>	– les plus simples des organismes cellulaires. Leur DNA n'est pas isolé du reste du contenu cellulaire et il n'y a pas de mitochondries.

<i>prophage</i>	– génome (DNA) d'un bactériophage tempéré, lorsqu'il est intégré dans le chromosome d'une bactérie lysogène.
<i>répresseur</i>	– produit d'un <i>gène de régulation</i> . Sa fixation à l'origine d'un <i>opéron</i> (au niveau de l' <i>opérateur</i>) empêche la transcription de l' <i>opéron</i> . Beaucoup de répresseurs peuvent être inactivés par un inducteur (petite molécule spécifique, rayonnement UV).
<i>ribosomes</i>	– organites cellulaires localisés dans le cytoplasme, sièges de la synthèse des protéines. Ils fonctionnent comme des têtes de lecture, qui traduisent le message génétique (présent dans le <i>RNA messenger</i> sous la forme d'une séquence de nucléotides) en la séquence d'acides aminés caractéristique d'une protéine.
<i>RNA (= ARN)</i>	– macromolécules formées d'une longue séquence de nucléotides. L'une des formes de RNA, le <i>RNA messenger</i> , assure la transmission de l'information du noyau (où se trouve le matériel génétique (DNA) et où est synthétisé le RNA) au cytoplasme (où les protéines sont synthétisées sur les ribosomes en utilisant le <i>RNA messenger</i> comme modèle).
<i>virion</i>	– particule de virus, constituée du matériel génétique (acide nucléique) entouré d'une capsidie protéique.

Hubert Chantrenne

Titre I

La formation des protéines

RÉSUMÉ

Les principes du mécanisme de la synthèse des protéines sont connus, mais il reste bien des points obscurs, que les chercheurs s'efforcent d'élucider. Comme exemples de problèmes actuels, nous esquisserons dans les quelques pages qui suivent trois lignes de recherche poursuivies actuellement dans le laboratoire de Chimie biologique du Département de Biologie moléculaire de l'U.L.B. Elles concernent les ARN messagers, la fidélité de la traduction et la structure tridimensionnelle des protéines.

ARN MESSAGERS D'EUCARYOTES

Le mécanisme de la synthèse des protéines chez les eucaryotes est presque identique à celui que nous avons esquissé dans le chapitre précédent pour les bactéries. Toutefois, les messagers des eucaryotes (*), contrairement à ceux des bactéries restent fonctionnels pendant plusieurs jours dans la cellule, et leur structure est assez différente de celle des messagers bactériens. Alors qu'un messenger de bactérie est le produit de transcription immédiat du gène, la synthèse des messagers d'eucaryotes est beaucoup plus compliquée : le segment d'ADN transcrit est beaucoup plus long que le messenger finalement utilisé pour programmer la machine à faire les protéines.

Considérons par exemple le messenger de la chaîne β de l'hémoglobine. Le produit de transcription du gène contient 1567 nucléotides, alors qu'il suffirait de 444 nucléotides pour coder les 146 acides aminés de cette chaîne et les deux signaux de mise en phase et de terminaison.

(*) C'est à l'U.L.B. que A. Burny et G. Marbaix ont réussi pour la première fois l'isolement d'un messenger d'eucaryote, celui de l'hémoglobine. La méthode qu'ils ont décrite est devenue classique ; elle a une grande importance en génie génétique.

La longue molécule transcrite est modifiée par adjonction à l'un des bouts d'un nucléotide disposé d'une manière particulière – nous l'appelons la coiffe du messager – et par addition à l'autre bout d'une séquence monotone de A, qui n'est pas codée dans le DNA mais ajoutée par une polymérase particulière. Ensuite se produit l'épissage qui élimine notamment deux introns de 116 et 646 nucléotides respectivement ; ce sont des régions intercalaires non codantes dont la fonction ne nous est pas encore connue et qui sont rapidement détruites après leur excision.

Le messager fonctionnel se présente comme indiqué sur la figure. La coiffe est suivie d'une séquence de 50 bases qui n'est pas traduite, puis viennent les 444 bases codant la chaîne de l'hémoglobine, puis une nouvelle séquence muette de 131 bases, et enfin une suite de plus de 100A. Le messager fonctionnel contient donc environ 750 bases alors que 444 suffisent pour porter l'information de la protéine. Nous cherchons à comprendre à quoi servent les séquences non traduites.

Au département de Biologie moléculaire de l'U.L.B. G. Marbaix et G. Huez ont découvert une fonction de la séquence polyadénylique (poly A) qui se trouve à l'extrémité terminale de la plupart des messagers d'eucaryotes. Ils ont montré qu'elle protège le messager contre la destruction ; c'est un des facteurs (mais non le seul) qui déterminent la longévité des messagers.

Plusieurs systèmes biochimiques permettent de traduire *in vitro* un messager isolé. Par exemple, un extrait de réticulocytes de lapin, un extrait de germes de blé ou encore de cellules cancéreuses humaines sont les systèmes utilisés le plus couramment au laboratoire dans ce but. Si on ajoute à de tels extraits du messager d'hémoglobine, ils produisent de l'hémoglobine pendant environ une demi-heure dans les conditions habituelles puis ils s'inactivent parce que certains constituants se désorganisent dans les conditions artificielles qui existent *in vitro*. L'idéal serait de faire traduire un messager par une cellule vivante dans laquelle les systèmes homéostatiques de la cellule assurent le maintien de conditions optimales. Cela fut réalisé pour la première fois par G. Marbaix en collaboration avec J. Gurdon et Lane alors à l'Université d'Oxford, en injectant le messager de l'hémoglobine de lapin à des cellules énormes, les oocytes de batraciens. Ces cellules ont un diamètre d'un demi-millimètre, on peut les prélever sans difficulté dans l'ovaire des animaux et les garder dans l'eau où elles survivent en bon état pendant quinze jours.

Si on injecte un cent millième de milligramme d'ARN messenger d'hémoglobine de lapin à un oocyte de crapaud, celui-ci fabrique de l'hémoglobine de lapin pendant quinze jours. Le messenger reste donc fonctionnel pendant longtemps dans cette cellule vivante. Toutefois, si à l'aide d'une enzyme adéquate on enlève la séquence polyadénylique du messenger sans toucher au restant de la molécule, on constate que ce messenger tronqué fonctionne parfaitement pendant quelques heures dans l'oocyte, mais qu'il est ensuite détruit alors que le messenger pourvu de la séquence polyadénylique aurait fonctionné quinze jours.

Certains messagers naturels n'ont pas de queue poly A ; par exemple ceux des histones, protéines qui sont synthétisées pendant une phase assez brève de la division cellulaire. Ces messagers injectés à des œufs de crapaud fonctionnent bien, mais leur traduction cesse au bout d'une dizaine d'heures, ils sont détruits. Mais si, à l'aide d'une enzyme on ajoute à leur extrémité une séquence d'une trentaine de A, ils sont stabilisés et leur traduction peut se poursuivre pendant dix jours. Il faut au moins 15A pour stabiliser un messenger.

La protection assurée par la séquence polyadénylique n'est pas une curiosité tenant à des propriétés particulières de l'oocyte de crapaud, c'est sans doute un phénomène général. En effet, G. Huez a réussi récemment à injecter des messagers dans des cellules humaines en culture ; ils sont bien traduits et là aussi leur durée de vie dépend de la séquence polyadénylique. Les résultats obtenus avec les cellules humaines sont tout à fait semblables à ceux que nous avons décrits pour les oocytes de crapaud, seule l'échelle des temps est raccourcie.

L'intérêt que nous portons à la queue polyadénylique des ARN messagers de lapin injectés à des œufs de crapaud ou à des cellules humaines peut paraître très «académique», mais nul n'ignore les espoirs suscités par le génie génétique. Or, l'efficacité de la production d'une protéine chez un eucaryote dépend directement de la stabilité fonctionnelle de son messenger ; il importe donc de savoir ce qui la conditionne, afin de pouvoir l'assurer dans les applications du génie génétique. A ce point de vue, les résultats décrits ci-dessus sont d'une grande portée.

FIDÉLITÉ DE LA TRADUCTION DE L'INFORMATION

Dans la cellule vivante, la machine qui fait les protéines ne commet pas plus d'une erreur pour dix mille acides aminés mis en place. Les

interactions moléculaires sur lesquelles la traduction repose sont donc d'une très grande précision.

Les deux phénomènes principaux de «reconnaissance» entre molécules impliqués dans la synthèse des protéines sont l'accrochage de l'acide aminé adéquat à chaque acide nucléique de transfert (tRNA), et l'association correcte de l'anticodon de ces ARN avec les codons correspondants du messenger.

La sélectivité de chacune de ces étapes défie – à première vue – les lois de la thermodynamique. En effet, il est raisonnable de supposer que la discrimination des codons par les anticodons, ou d'un ARN de transfert parmi les autres par la ligase qui y fixera l'acide aminé est déterminée par la différence d'énergie libre entre interaction correcte et incorrecte des molécules impliquées. Or, des études thermodynamiques de l'interaction des divers tRNA purifiés avec les ligases des 20 acides aminés montrent que les constantes d'affinité sont très élevées dans tous les cas, et qu'il n'y a guère de différence d'affinité entre interactions correctes et incorrectes ; beaucoup trop peu en tous cas pour rendre compte de la sélectivité observée in vivo.

La sélectivité de l'interaction codon-anticodon nous confronte à une énigme semblable : L'examen du code génétique montre que le remplacement d'une base par une autre peut suffire à changer complètement la signification d'un codon. Par exemple GAG signifie Acide glutamique tandis que GCG signifie Alanine. La sélectivité de l'association de l'anticodon du tRNA avec le codon correspondant du messenger dépend de la formation de ponts d'hydrogène entre bases complémentaires (A avec U, C avec G). On peut estimer que le remplacement d'une base A, capable de former deux ponts d'hydrogène avec U, par C qui ne peut en former correspond en milieu aqueux à une différence d'énergie de l'ordre de 2kcal, alors qu'il faudrait 5kcal pour expliquer une discrimination de 1 sur 10.000 qui est la valeur réelle observée.

Comment s'expliquent donc cette étonnante précision des interactions qui paraît se jouer des principes physiques les plus solides ?

Au département de Biologie moléculaire de l'U.L.B., H. Grosjean et S. de Henau ont abordé l'analyse de ces phénomènes de deux façons : d'une part en étudiant la cinétique des ligases ou l'interaction d'anticodons complémentaires par la méthode du «saut de température» qui permet de déterminer les paramètres thermodynamiques et cinétiques de l'association ; d'autre part, ils ont modifié artificiellement

des ARN de transfert notamment en remplaçant l'anticodon d'un ARN par un autre triplet, ou encore une base modifiée naturelle par la base non modifiée ; ils ont étudié l'effet de cette chirurgie moléculaire sur la précision de la traduction en injectant ces ARN de transfert à des œufs de crapaud en même temps qu'un ARN messager connu, afin de mesurer les erreurs de traduction provoquées.

Parmi d'autres résultats intéressants que nous ne mentionnerons pas, il ressort de ces recherches que la formation du complexe entre tRNA et ligase ou l'association d'un anticodon avec un codon correspondant ne sont pas comparables à l'union de deux formes rigides qui s'épousent parfaitement comme une médaille et la matrice qui a servi à la frapper. C'est un phénomène beaucoup plus subtil, impliquant des changements de conformation des molécules confrontées, une coaptation dynamique concertée qui conditionne la réaction catalysée par l'enzyme, affecte les paramètres cinétiques, ou stabilise le complexe en provoquant indirectement des interactions inter- ou intramoléculaires nouvelles. C'est donc plutôt de mécanique moléculaire que de structure statique qu'il s'agit.

Par exemple, lorsqu'un tRNA est confronté avec une ligase quelconque, il s'y associe temporairement ; cette association est suivie immédiatement d'un changement de conformation de l'enzyme et du tRNA. Si le tRNA correspond à l'acide aminé activé par la ligase, la réaction enzymatique se produit, l'acide aminé se lie au tRNA ; sinon, aucune activité catalytique n'est induite, et le complexe se dissocie bientôt comme il s'était formé. L'enzyme ne distingue pas les tRNA en reconnaissant une séquence particulière de bases (la comparaison des séquences de tRNA divers qui sont chargés par une même enzyme le prouve clairement) ; ce qui importe, c'est la disposition relative des groupes après la transconformation concertée induite mutuellement dans les deux molécules par leur interaction.

De précieuses indications sur l'association d'un codon avec un anticodon ont pu être obtenues par H. Grosjean ; il a étudié un phénomène plus simple directement comparable et qui permet une étude physico-chimique précise : l'interaction de paires de tRNA dont les anticodons sont complémentaires. Ici aussi les aspects dynamiques sont essentiels ; les résultats montrent que la stabilité et la sélectivité d'association ne dépendent pas seulement de l'établissement de ponts d'hydrogène entre bases complémentaires ; d'autres contraintes interviennent : conformation de la boucle de l'anticodon, empilement des

bases appariées ; de plus, le déplacement de bases voisines prolonge l'empilement et – fait très remarquable – module l'énergie d'interaction de telle sorte que tous les complexes corrects ont à peu près la même durée de vie malgré des différences de composition en bases qui feraient prévoir des durées de vie très différentes, s'étalant sur près de trois ordres de grandeur.

Tout cela montre combien les macromolécules biologiques sont perfectionnées. Il faut se garder de toute idée simpliste en les considérant ; les macromolécules biologiques sont bien plus que des molécules ordinaires : ce sont des organes de dimensions moléculaires.

ACQUISITION DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE

Lorsqu'une chaîne polypeptidique en formation émerge du ribosome, elle se replie sur elle-même et acquiert peu à peu sa conformation définitive. Ce repliement est spontané, il résulte de nombreuses interactions ou, si l'on veut, de l'établissement de nombreuses liaisons faibles entre les diverses parties de la chaîne d'acides aminés, et de l'effet hydrophobe qui tend à réduire la surface de contact avec l'eau.

Nous connaissons à présent la structure tridimensionnelle de plus de cent protéines différentes. Elle peut être déduite de l'analyse des diagrammes de diffraction des rayons X par les cristaux de protéines. A l'état cristallisé, les molécules d'une protéine sont arrangées régulièrement, elles se touchent en quelques points (comme des billes bien rangées dans une boîte) mais à part ces contacts, elles sont complètement entourées d'eau ; les cristaux de protéines peuvent contenir 40% d'eau, par exemple. L'environnement des molécules dans le cristal est donc très semblable à celui d'une solution ; aussi la conformation est-elle presque la même dans le cristal qu'en solution. Tout au plus le réseau cristallin peut-il immobiliser à la surface des molécules certains groupes qui sont plus mobiles dans la solution.

Nous avons dit plus haut que la structure tridimensionnelle est déterminée par la séquence des acides aminés. Il doit donc être possible, en principe, de prévoir cette structure quand on connaît la séquence des acides aminés. Mais c'est un problème d'une extrême complexité, qui n'est que très partiellement résolu aujourd'hui.

La comparaison des structures connues montre que certains types de repliements se retrouvent dans la plupart des protéines : l'hélice α , les feuillets β et le tournant β . Dans l'hélice α , la chaîne d'acides aminés est

enroulée en tire-bouchon et maintenue sous cette forme par des ponts d'hydrogène et des forces de van der Waals entre les spires voisines. Dans les feuillets β , plusieurs chaînes parallèles ou antiparallèles sont maintenues entr'elles par les mêmes types de forces et elles s'inscrivent dans une surface gauchie ; les tournants β sont observés aux endroits où une chaîne revient sur elle-même pour former un feuillet β .

Ces motifs de structure, dont les paramètres sont presque identiques dans toutes les protéines, résultent d'interactions qui ne dépendent que secondairement de la séquence des acides aminés ; c'est pour cela qu'on les rencontre si souvent. Et si les protéines étaient constituées seulement d'hélices α et de feuillets β , il serait sans doute facile de prévoir leur conformation. Mais ces motifs ne représentent généralement qu'une partie de la protéine, la moitié par exemple ; les régions qui ne sont pas disposées selon ces types de repliement adoptent les conformations les plus diverses à cause d'interactions particulières entre les chaînes latérales des acides aminés, ou sous l'effet hydrophobe qui tend à enfouir les chaînes latérales lipophiles et à maintenir en surface les groupes hydrophiles, ou encore par suite de l'attraction électrostatique qui maintient à l'intérieur de la molécule des groupes ionisés de signes contraires.

La structure adoptée par la chaîne est un compromis qui correspond à un état d'énergie minimum du système protéine-eau, un état d'équilibre entre toutes ces interactions.

Si on pouvait calculer avec précision toutes les forces impliquées pour toutes les conformations concevables, on pourrait connaître la conformation d'énergie minimum que la chaîne adopte spontanément. Mais c'est un problème d'une effroyable complexité.

On peut estimer l'énergie conformationnelle en faisant la somme algébrique de toutes les interactions individuelles entre atomes ; mais c'est une somme d'un grand nombre de termes que nous ne pouvons pas calculer avec une très grande précision ; de plus, l'énergie conformationnelle résultante est petite en valeur absolue par rapport à certains des termes de la somme. Par exemple dans le cas du lysozyme, une protéine très bien connue, on peut estimer à 300 kcal/mole la perte d'entropie de la chaîne qui se fige ; cet effet déstabilisant est compensé par l'effet hydrophobe dont la contribution est du même ordre et de signe contraire, et la différence n'est que de quelques kcal. Ajoutons qu'il existe souvent plusieurs conformations d'énergies voisines, plusieurs puits de potentiel séparés par des barrières peu élevées. Ceci

reflète d'ailleurs la plasticité des protéines, qui est si importante pour leur fonction.

A l'heure actuelle, on arrive par des calculs quantiques *ab initio* ou à l'aide de méthodes semi-empiriques à prévoir à peu près correctement la conformation qu'adopte préférentiellement une chaîne de 5 à 10 acides aminés, ou un peu plus dans des cas favorables. Ainsi, J.-L. De Coen et C. Humblet ont constaté par le calcul conformationnel que la molécule d'encéphaline (un peptide analgésique naturel produit dans le cerveau) adopte spontanément une conformation qui est presque superposable à une molécule de morphine. On comprend par cet exemple tiré d'un travail de notre laboratoire, tout l'intérêt que de tels calculs peuvent présenter pour la création d'agents pharmacologiques nouveaux.

Des progrès notables dans l'étude de la conformation des protéines ont été faits récemment grâce au développement du «graphique interactif». Il s'agit d'un appareil, branché sur ordinateur, qui fait apparaître sur écran cathodique le modèle moléculaire dont on lui fournit les coordonnées. Divers programmes permettent de fait tourner le modèle autour d'un axe choisi, de donner des images stéréoscopiques, d'observer des détails de la structure ; il est possible aussi de modifier à volonté la structure, de déplacer un atome et de faire immédiatement calculer par l'ordinateur par exemple les changements d'énergie qu'entraînerait une telle modification, etc ... Il s'établit ainsi entre l'opérateur et l'appareil un dialogue dans lequel la puissance de calcul de l'ordinateur est constamment dirigée par l'intelligence et le flair du chercheur.

Dans le cadre d'une collaboration interuniversitaire, un tel instrument a été réalisé à l'U.L.B. sous l'impulsion de S. Wodak qui est un pionnier de ce domaine, car elle a participé au développement d'une des premières installations de ce type à la Columbia University.

Parmi les problèmes étudiés à présent avec cet équipement, nous mentionnerons seulement l'interaction d'une enzyme avec son substrat, ou l'association de deux protéines, problèmes aussi difficiles que la prévision de la conformation par le calcul, et que le graphique interactif permet d'aborder.

On peut s'étonner qu'il soit si difficile de calculer la conformation d'une protéine ou l'interaction d'une enzyme avec son substrat bien qu'on sache quelles sont les forces qui jouent, et alors que les chaînes d'acides aminés se replient spontanément sans erreur et que le substrat

trouve sa place sur l'enzyme en une fraction de milliseconde. Peut-être convient-il de rappeler ici une boutade de L. Infeld à propos d'un problème difficile de physique : «La Nature ne se soucie pas de nos difficultés mathématiques ; elle intègre empiriquement».

RÉFÉRENCES

F. CHAPEVILLE et A. L. HAENNI, *Biosynthèse des protéines*, Paris, Herman, 1980.
J. A. LAKE, *The Ribosome*, *Scientific American*, Aug. 1981, pp. 56-69.

Titre II

Quelques aspects de l'évolution moléculaire des peptides primitifs aux familles multigéniques

RÉSUMÉ

Bien que la probabilité d'apparition spontanée d'une protéine comportant 100 acides aminés de séquence définie soit de l'ordre de 10^{-130} , on estime qu'il existe actuellement 10^{10} protéines fonctionnelles distinctes. Ce paradoxe souligne bien l'importance qu'ont dû avoir tout au cours de l'évolution les mécanismes permettant l'allongement et la diversification des chaînes polypeptidiques.

Si l'observation des structures tridimensionnelles des protéines actuelles conduit à penser que les structures qui étaient impliquées dans l'activité biologique primitive ont été stabilisées par l'accroissement de la taille des peptides originaux, l'analyse de leur séquence indique que différents mécanismes sont probablement à la base de cet allongement : duplications intragéniques totales ou partielles des gènes originaux, addition de peptides aléatoires, ...

D'autre part, l'apparition de nouvelles fonctions trouve le plus souvent son origine dans les mécanismes de duplication de gènes : on connaît actuellement 100 familles de gènes apparentés et on estime qu'il en existe à peu près 1000. On a, par exemple, montré qu'il y a des relations phylogénétiques entre les immunoglobulines et des protéines de membrane comme les produits codés au sein du locus majeur d'histocompatibilité.

De plus, l'hyperduplication de quelques gènes originaux a permis l'émergence des familles de gènes répétés ; familles multiplicationnelles (par exemple, les RNA ribosomiaux) ou informatives (par exemple, les régions variables des immunoglobulines) qui doivent probablement leur développement et leur pérennité au même mécanisme : les crossing-overs paralogues et la conversion génique.

Un polypeptide est entièrement défini par la séquence de ses acides aminés, qui est considérée comme le produit d'une évolution basée sur la sélection ou le rejet de substitutions aléatoires. On estime à 10^{10} le nombre de protéines différentes que l'on pourrait trouver dans les organismes actuels ; une telle diversité peut sembler bien paradoxale si l'on considère que la fréquence à laquelle apparaîtrait spontanément un gène comportant 1000 nucléotides de séquence déterminée est inférieure à 10^{-400} (SALISBURY, 1969).

Ce paradoxe souligne bien l'importance qu'a dû avoir la diversification des chaînes polypeptidiques au cours de l'évolution : une centaine de familles de gènes apparentés sont actuellement connues et on estime généralement qu'il en existe à peu près mille (ZUCKERKANDL, 1975). D'autre part, on admet généralement que c'est l'allongement des chaînes polypeptidiques tout au cours de l'évolution, qui a permis l'acquisition de fonctions de plus en plus sophistiquées : les protéines caractérisant les formes de vie primitive comportaient vraisemblablement peu de résidus et devaient donc présenter plusieurs états conformationnels. Dans ces conditions, il est probable que la sélection naturelle a favorisé l'augmentation de la complexité de ces molécules dans les cas où celle-ci permettait la stabilisation des structures associées à l'activité biologique optimale.

De nombreux «accidents génétiques» peuvent conduire à l'allongement des chaînes polypeptidiques ; c'est le cas des fusions de gènes (ex. : Tryptophane synthétase : JANOFSKY (1960) et BONNER *et al* (1965), des crossing-over non conjugués (Hémoglobine Gunhill : BRADLEY, 1967), des mutations affectant les codons fin de chaîne (hémoglobine constant Spring : WEATHERALL et CLEGG, 1972) et des duplications intragéniques.

ECK et DAYHOFF (1966) ayant montré que les séquences des deux moitiés de la ferredoxine de *Clostridium* sont pratiquement identiques, les duplications intragéniques ont été considérées comme le principal mécanisme de l'allongement des chaînes polypeptidiques. Selon ces

auteurs, la séquence primitive formant une unité structurale simple aurait été copiée un certain nombre de fois, conduisant à la formation d'une protéine avec une structure secondaire répétitive. Néanmoins, différentes considérations structurales donnent à penser que la protéine résultante a peu de chance d'avoir une structure tertiaire compatible avec l'activité biologique du polypeptide original. Cette nécessité a conduit à la présentation d'hypothèses alternatives : d'une part, un mécanisme alliant la duplication et la fusion des gènes dupliqués et d'autre part, la stabilisation du conformère actif par l'addition séquentielle de petites séquences «stabilisatrices». Selon la première alternative (WOESE, 1971), la conformation spatiale compatible avec l'activité biologique du polypeptide original aurait été consolidée par la formation d'une structure quaternaire. Une duplication aurait permis l'évolution différentielle des deux protomères tout en améliorant l'activité biologique de l'oligomère. Dès lors, la fusion des gènes codant pour les deux protomères serait à la base de l'apparition d'une structure tertiaire beaucoup plus stable que celle du polypeptide original tout en conservant son activité biologique. Selon la seconde alternative (McLACHLAN, 1972), la sélection naturelle aurait favorisé l'addition de petites séquences d'acides aminés stabilisant l'environnement immédiat du site actif, créant ainsi une structure tertiaire de plus en plus stable, tout en maintenant l'activité biologique de la protéine originale. L'origine de ces sous-séquences «stabilisatrices» : aléatoire ou résultant de duplications intragéniques partielles, n'est pas précisée.

Ces différentes hypothèses ne sont nullement exclusives ; on peut les illustrer par différents exemples : certaines protéines actuelles montrent une périodicité dans la séquence de leurs acides aminés (YCAS, 1972), d'autres exhibent des structures tertiaires qui semblent résulter de la fusion de deux unités structurales identiques (McLACHLAN, 1980, suite de cet exposé), d'autres montrent des répétitions de petites sous-séquences d'acides aminés (WUILMART *et al* (1975), d'autres enfin ne semblent pas contenir de régularités internes significatives (McLACHLAN, 1971).

Néanmoins, les répétitions linéaires d'acides aminés ne constituent pas le seul type de régularités internes exhibées par les séquences protéiques : l'existence de segments symétriques d'acides aminés a également été établie (URBAIN, 1969 ; WUILMART *et al*, 1975 ; DELHAISE *et al*, 1980). Si l'on se réfère à la polarisation stricte des enzymes qui régissent la machinerie génétique, il faut admettre que les symétries

d'acides aminés doivent trouver leur origine dans les contraintes structurales des chaînes polypeptidiques. On a ainsi pu montrer que les symétries d'acides aminés se retrouvent très souvent au niveau des interactions entre deux brins β anti-parallèles (WUILMART *et al*, 1975). Les feuilletts plissés β parallèles existant également, il est dès lors possible qu'ils génèrent des répétitions linéaires d'acides aminés, auquel cas ce dernier type de régularité interne ne serait-il pas toujours la conséquence d'une duplication intragénique mais parfois le résultat de contraintes structurales ! D'autre part, on peut se demander si les régularités structurales que l'on observe au niveau des hélices α engendrent ou non des régularités internes au niveau des séquences d'acides aminés ?

Ce type de problème a été abordé grâce à l'analyse statistique d'un échantillon de 51 protéines dont on connaît les structures primaire et tertiaire (LEVITT et GREER, 1977). Les analyses décrites ci-dessous ont été réalisées sur la base de deux tests différents. Dans un premier test, la ressemblance entre deux acides aminés est estimée à partir du nombre minimum de mutations qui sont nécessaires à leur interconversion : ce premier test est donc purement génétique et reflète la généalogie des positions occupées par les deux acides aminés que l'on compare. Dans un second test, la ressemblance existant entre deux acides aminés est donnée par les fréquences relatives de substitution d'acides aminés qui ont été observées dans différentes familles de protéines homologues (DAYHOFF, 1972) : ce second test a donc un aspect structural puisqu'une protéine maintient ses structures secondaire et tertiaire au cours de l'évolution et ce, malgré les mutations qui s'accumulent dans sa structure primaire (DICKERSON, R.E. 1971). La méthode d'analyse peut être brièvement schématisée comme suit :

- chaque segment de n acides aminés est comparé à tous les autres segments de n acides aminés lus en polarité normale (cas des duplications linéaires) ou inversée (cas des symétries d'acides aminés) ;
- pour chaque comparaison, les scores (donnés par l'un ou l'autre des deux tests précités) correspondant à chacun des n couples d'acides aminés sont additionnés ;
- lorsque toutes les comparaisons possibles ont été effectuées, on compare la fréquence des différents résultats avec leur probabilité. Celle-ci est obtenue en employant, soit la distribution multinomiale,

- soit en observant les résultats obtenus à partir de séquences aléatoires de même longueur et de même composition que la séquence étudiée ;
- la signification statistique des écarts que l'on observe entre la fréquence des différents résultats et leur probabilité est estimée par le test du Chi carré apparent (FITCH, 1970) ;
 - la distribution des 51 Chi carrés obtenus en analysant chacune des 51 protéines constituant notre échantillon est alors comparée à la distribution théorique du Chi-carré et à des distributions de Chi carré obtenues en analysant différents échantillons de séquences aléatoires d'acides aminés.

Dans une première approche, nous avons tenté de déterminer la longueur moyenne des segments d'acides aminés constituant les deux types de régularités internes. Pour ce faire, les différentes protéines constituant notre échantillon ont été analysées en comparant des segments de 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 ou 35 acides aminés. Après chaque analyse, la distribution des Chi carrés obtenus a été comparée à sa distribution théorique. Les résultats sont les suivants :

- L'emploi du test structural conduit généralement à des résultats plus significatifs ; tant dans le cas des répétitions linéaires que des symétries d'acides aminés.
- Différents résultats sont obtenus suivant le type de structure secondaire qui prédomine dans la protéine analysée et cela, tant dans le cas des répétitions linéaires que des symétries d'acides aminés.
- Les protéines où les hélices α prédominent exhibent généralement des répétitions linéaires ou/et symétriques d'acides aminés dont la longueur moyenne se situe aux alentours de 15 à 17 acides aminés (notons que la longueur moyenne des hélices α dans le stock de protéines que nous avons utilisé est de 14 acides aminés).
- Les protéines où les brins β prédominent exhibent également les deux types de régularités internes, mais de façon moins significative. Dans ce cas, la longueur moyenne des répétitions linéaires et/ou symétriques est de 9 acides aminés (la longueur moyenne des brins β dans le stock de protéines que nous avons utilisé est de 7 acides aminés).

On constate donc que les deux types de régularités internes ont les mêmes caractéristiques et semblent dans la plupart des cas liés à l'existence de structures secondaires organisées. Néanmoins, il faut

souligner quelques exceptions à cette règle : les répétitions linéaires d'acides aminés sont plus significatives et plus longues que les répétitions symétriques d'acides aminés dans les séquences suivantes : Ferredoxine, différents domaines des Immunoglobulines, Subtilisine BPN', Carboxypeptidase A et Rubredoxine ; ce qui plaide en faveur de duplications intragéniques de parties importantes de leur séquence.

Dans une seconde approche, nous avons pu montrer de façon claire la liaison existant, dans la plupart des cas, entre l'apparition de chacun des deux types de régularités internes et l'existence des structures secondaires organisées : la méthode d'analyse est identique à la précédente ; cette fois, toutes les protéines sont analysées en comparant des segments de 7 acides aminés et les comparaisons sont restreintes aux régions des protéines exhibant des types identiques de structure secondaire (soit les hélices α , soit les brins β).

Les résultats sont les suivants :

- l'emploi du test structural conduit à des résultats de loin plus significatifs que ceux qui sont obtenus par le test génétique ;
- tant dans le cas des répétitions linéaires d'acides aminés que dans celui des répétitions symétriques, les résultats obtenus à partir des comparaisons effectuées entre différentes régions de même structure secondaire, sont beaucoup plus significatifs que ceux qui étaient obtenus en analysant les séquences entières ;
- les résultats sont plus significatifs lorsque l'analyse est restreinte aux hélices α .

La localisation privilégiée des répétitions linéaires d'acides aminés au sein de sous-régions de structure secondaire organisée pourrait s'expliquer de façon génétique si on suppose que les régions de la protéine ayant une structure secondaire définie évoluent plus lentement que le reste de la molécule. Cependant, 'la liaison existant entre l'apparition des répétitions linéaires et symétriques d'acides aminés indique que ces deux types de régularités ont probablement la même origine structurale. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé entre elles différentes protéines appartenant à des familles génétiques différentes. 190 comparaisons ont été effectuées au sein d'un échantillon de 20 protéines. Lorsque les acides aminés sont comparés sur la base d'un test génétique, on peut observer que la fréquence des protéines qui partagent des segments d'acides aminés est tout à fait conforme à celle qui est prédite sur des bases aléatoires. Cette fréquence augmente légèrement lorsque les segments d'acides aminés sont

comparés à l'aide du test structural mais elle reste peu significative. Au contraire, lorsque les comparaisons sont restreintes aux portions des protéines exhibant le même type de structure secondaire, on constate qu'il existe des homologies de séquence très significatives, tant entre brins β qu'hélices α appartenant à des protéines non apparentées. Il est dès lors probable qu'une partie importante des répétitions linéaires d'acides aminés trouvent leur origine dans les contraintes structurales qui ont lieu au niveau des structures secondaires. En effet lorsqu'on compare des régions protéiques exhibant le même type de structure secondaire, les répétitions linéaires d'acides aminés apparaissent le plus souvent à la même fréquence que les répétitions symétriques d'acides aminés à qui l'on attribue une origine structurale. Dans le cas des structures en hélice α , on observe une corrélation linéaire ($r = 0.7$) lorsque l'on compare les fréquences auxquelles apparaissent les deux types de régularités internes dans chacune des 51 protéines de notre échantillon. Au contraire, la comparaison des fréquences d'apparition de ces deux types de régularités internes au sein des régions β ne donne pas de résultat satisfaisant ($r = .4$). Il semble que l'apparition privilégiée de ces deux types de régularités internes au sein des régions ayant une structure secondaire organisée trouve son origine dans l'alternance régulière d'hydrophobicité qui caractérise les séquences des hélices α et des brins β : dans les hélices α , deux résidus hydrophobes sont le plus souvent suivis de deux résidus hydrophiles, tandis que résidus hydrophobes et hydrophiles alternent la plupart du temps dans les séquences des brins β . Lorsqu'on quantifie la régularité de ces deux types d'alternance, il apparaît que les corrélations entre les hydrophobicités des résidus i et $i \pm 2$ d'une part, et celles des résidus i et $i \pm 4$, d'autre part, valent respectivement $-.7$ et $.9$ dans le cas des hélices α tandis que les corrélations entre les hydrophobicités des résidus i et $i \pm 1$ d'une part et celles des résidus i et $i \pm 2$, d'autre part valent respectivement $-.8$ et $.4$ dans le cas des brins β . On peut donc raisonnablement supposer que la différence entre les régularités de l'alternance d'hydrophobicité exhibée par chacun des deux types de structure secondaire explique pourquoi les régularités internes que nous avons mises en évidence apparaissent plus souvent au sein des régions protéiques en hélice α .

Cette étude montre donc que le partage de petits segments homologues d'acides aminés par différentes régions d'un polypeptide ou par différents polypeptides ne plaide pas automatiquement en faveur

d'une homologie génétique mais indique seulement que les structures secondaires des segments homologues sont identiques. Cette conclusion est illustrée par les deux alignements suivants qui montrent comment une alternance régulière d'hydrophobicité peut engendrer des homologies entre des segments provenant de protéines ne partageant pas leur origine génétique.

a)

100	Gly	Glu	Tyr	Gly	Glu	Pro	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Leu	111
165	Asn	Glu	Ala	Ile	Ser	Asp	Ile	Phe	Gly	Thr	Leu	Val	176
180	Asp	Asp	Val	Phe	Ser	Gln	Val	Cys	Thr	His	Leu		190
188	Arg	Gly	Trp	Leu	Lys	Thr	His	Val	Ser	Asp	Ala	Val	199

b)

16	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr						22
69		Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Asp						74
188	Glu	Val	Ser	Phe	Glu	Ala	Thr	Phe	Thr				196
40		Phe	Thr	Tyr	Asp	Ala	Lys	Tyr	Arg				47

Dans le premier cas (a), les séquences proviennent des régions en hélice α de la carboxyhémoglobine, de la thermolysine, de l'adélynate kinase et de la triose-phosphate-isomérase ; dans le second cas (b), elles proviennent des régions en brins β de l'immunoglobuline, de la préalbumine, de la concanavaleine A et de la thermolysine.

Si les petits segments homologues que l'on retrouve actuellement dans la plupart des protéines sont d'origine structurale, les duplications intragéniques sont loin de constituer un phénomène singulier : 1/10 des protéines que nous avons étudiées exhibent de longues homologies internes et l'on peut supposer que l'accumulation des mutations qui se produisent tout au cours de l'évolution d'une séquence masque peu à peu la plupart des longues homologies : de nombreuses protéines exhibent des régions ayant une «structure tertiaire» plus ou moins semblable alors qu'elles ne partagent pas la séquence de leurs acides aminés. Parallèlement aux duplications intragéniques, la diversification des chaînes polypeptidiques par duplication de gène a également joué un rôle important dans l'adaptation des protéines à leur différentes fonctions biologiques. Ces duplications apportent aux organismes haploïdes les avantages qui étaient réservés aux diploïdes : les différents isozymes des déhydrogenases ont des activités biologiques optimales à différentes tensions d'O₂ ; elles permettent l'apparition de nouvelles

fonctions : la trypsine et la chymotrypsine hydrolysent les liens peptidiques différents ...

Poussées à l'extrême, les duplications de gènes peuvent être à la base de l'amplification de la synthèse des produits codés par le gène original (c'est le cas des ARN ribosomiaux) ou permettre la multiplication de l'information contenue dans le gène original : c'est le cas des régions variables des immunoglobulines. On connaît actuellement trois groupes de régions variables dont les gènes sont situés sur des chromosomes distincts : V_H , V_λ et V_K . Chacun de ces différents groupes est constitué de nombreux gènes codant tous pour des régions variables différentes ; on estime que le nombre de gènes différents est de l'ordre du millier. Néanmoins, la région variable telle que nous venons de la définir n'inclut pas les 15 résidus carboxy terminaux du domaine variable, tel qu'il a été défini au niveau des séquences polypeptidiques. En fait, le gène de la région carboxyterminale (= pièce J) est présent à plus ou moins 5 exemplaires qui semblent pouvoir s'associer indifféremment à n'importe quel gène variable lors de la maturation somatique du gène de l'immunoglobuline. Pour la chaîne lourde, la situation est plus complexe puisqu'il existe une pièce D (dont le nombre de copies différentes est encore indéterminé) qui est insérée entre le gène variable et la pièce J pendant la maturation du gène. Le développement et la perpétuation d'une telle famille de gènes à travers l'évolution des vertébrés peut sembler bien paradoxale. Si la quantité d'information contenue au sein des gènes variables d'immunoglobuline s'explique par la nécessité de répondre de façon spécifique à des stimuli de nature imprévisible, on peut s'interroger sur les mécanismes qui permettent la conservation de gènes dont une grande partie ne semble pas être exploitée pendant la vie d'un individu.

Les séquences des différentes régions variables nous montrent qu'elles peuvent être subdivisées en différentes sous-régions : les résidus de charpente qui assurent la structure tertiaire du polypeptide et trois zones hypervariables qui assurent la spécificité de l'immunoglobuline. Dans ce cas, la sélection naturelle doit donc porter sur deux facteurs différents : le maintien de la diversité des zones hypervariables, (c'est-à-dire d'un nombre élevé de gènes) et le maintien de la constance des résidus de charpente qui permettent la mise en place du site actif.

Les différents groupes de gènes V semblent être périodiquement soumis à des contractions ou des expansions de leur contenu informatif ; ce phénomène résulte vraisemblablement de crossing-over

paralogues conjugués (= qui ont lieu entre endroits homologues de différents gènes). On constate par exemple, que la grande part de l'information est contenue dans les gènes λ chez la vache, tandis que les gènes K prédominent chez la souris. On a d'autre part pu montrer que le rapport des contenus informatifs des gènes K et λ est d'autant mieux conservé que les espèces sont phylogénétiquement proches. On associe généralement les structures palindromiques à l'initiation des fourches d'hétéroduplex ; nous avons pu montrer en analysant des séquences de messenger dégénéré qu'il y a une relation privilégiée entre l'existence des zones hypervariables et la densité palindromique (= nombre de fois qu'un résidu pourrait être associé à une structure palindromique) (WUILMART *et al*, 1977). Ces résultats préliminaires ont été vérifiés au niveau des séquences d'ADN des chaînes légères et on a constaté que certaines séquences palindromiques associées aux zones hypervariables des chaînes λ et K sont pratiquement récurrentes (70 à 80% d'homologie). Selon nous, la nature quasi-récurrente des séquences palindromiques existant dans les zones hypervariables pourrait induire un nombre non négligeable de crossing-over paralogues conjugués à l'échelle phylogénétique tout en minimisant leur influence à l'échelle du développement somatique. Ces crossing-over germinatifs entre membres différents d'un même sous-groupe pourraient permettre la sélection de leurs résidus de charpente (après un nombre suffisant de crossing-over, un membre quelconque du sous-groupe est le plus souvent répété un nombre élevé de fois) tout en maintenant la diversité (dans le cas où le nombre total des gènes d'un sous-groupe est plus ou moins conservé, on peut supposer que la migration des fourches d'hétéroduplex à travers les régions des gènes codant pour les zones hypervariables provoque des corrections aléatoires des appariements non complémentaires). Les mécanismes que nous venons de décrire pourraient être responsables du maintien d'immunoglobulines fonctionnelles mais ils ne sont vraisemblablement pas suffisant pour expliquer la conservation d'un nombre élevé de gènes «sans fonction apparente». Bien que la réponse immunitaire soit habituellement définie comme la reconnaissance spécifique de l'antigène, sa régulation repose sur la reconnaissance du soi : des interactions entre récepteurs immunoglobuliniques ayant des sites actifs complémentaires assurent la spécificité des différentes interactions lymphocytaires qui conduisent à l'expression ou à la suppression d'une spécificité moléculaire d'immunoglobuline. Ces interactions entre «sites actifs complémen-

taires» ont donné naissance au concept de réseau idiotypique dont l'implication dans la régulation de l'expression du système immunitaire est confirmée par un nombre croissant de données expérimentales. Le fonctionnement d'un tel réseau a une conséquence formelle très importante : le nombre d'unités moléculaires distinctes doit être défini de manière plus ou moins stricte ; s'il n'est pas suffisamment élevé, bon nombre de sites idiotypiques ne trouveront pas les sites anti-idiotypiques qui leur sont complémentaires, s'il est trop élevé, un idiotype interagira avec trop d'anti-idiotypes différents et la connectance du réseau sera trop élevée pour permettre l'apparition de boucles de rétroaction stables.

La nature des interactions idiotype-anti-idiotype est mieux comprise grâce aux résultats d'Atassi (1980). Lorsque l'antigène est de nature protéique, on peut élaborer un peptide de synthèse ayant une affinité pour le site antigénique grâce à des interactions de nature polaire et hydrophobe : si le site actif est Lys-Gly-Gly-Val-Gly-Asp, le peptide complémentaire est par exemple, Glu Gly Gly Val Gly Arg. C'est dans ces conditions qu'Atassi a, non seulement montré que le peptide complémentaire inhibe la fixation de l'anticorps sur l'antigène mais que son utilisation en tant qu'antigène conduit à l'obtention d'anticorps reconnaissant spécifiquement ceux qui étaient induits par l'antigène original.

Il est donc probable que les interactions idiotypiques reposent sur les liaisons qui ont lieu entre les chaînes latérales des acides aminés polaires ou hydrophobes des sites actifs.

La composition en acides aminés des régions hypervariables des chaînes lourdes (les chaînes légères ne semblent pas être associées aux chaînes lourdes au niveau des récepteurs des lymphocytes T régulant la réponse immunitaire) nous montre que la probabilité d'observer une complémentation entre deux unités moléculaires distinctes est de l'ordre de 10^{-3} . Cette valeur correspond à des données expérimentales montrant que la fréquence des cellules de rate reconnaissant une immunoglobuline monoclonale est de 2×10^{-3} . De plus, elle suggère que l'établissement d'un réseau idiotypique fonctionnel ne requiert pas un nombre très élevé d'unités moléculaires distinctes. Si l'on considère que le nombre d'unités fonctionnelles différentes est de 5000 dans le cas des domaines V_H (le nombre de gènes germinatifs se situe entre 100 et 500 et il existe probablement plus de 10 pièces D distinctes), on s'aperçoit que moins d'1% des idiotypes ne trouvent pas les sites anti-idiotypiques qui leur sont complémentaires, tandis que plus de

90 % des idiotypes ont la possibilité de s'associer à un nombre peu élevé de sites anti-idiotypiques différents : de 1 à 10 sites anti-idiotypiques par site idiotypique. Nous voyons donc que les mécanismes d'expansion et de contraction des gènes variables liés à l'action de la sélection naturelle au niveau du bon fonctionnement du réseau idiotypique pourraient expliquer la pérennité du grand nombre de gènes codant pour les régions variables des immunoglobulines dont l'origine génétique se situe vraisemblablement dans les systèmes primitifs de discrimination entre le soi et le non-soi.

On admet généralement qu'une nouvelle fonction biologique n'apparaît pas «de novo» mais se construit progressivement à partir d'une fonction préexistante. Il est donc important de souligner les relations fonctionnelles importantes qui existent entre les divers composants du système immunitaire et les différents produits qui sont codés au sein du locus d'histocompatibilité majeure. Parmi ceux-ci, les produits des locus HLA-A, -B et -C constituent l'obstacle le plus important aux greffes d'organes ; leur degré de polymorphisme est extraordinairement élevé : on connaît, par exemple, 20 allèles pour chacun des 2 loci HLA-A et -B. Un tel polymorphisme pourrait être la conséquence, au niveau de l'espèce, des mécanismes biologiques qui assurent la défense de l'individu contre les cellules modifiées (infectées par un virus ou tumorales). Un certain nombre d'hypothèses suggèrent en effet que les molécules HLA auraient été sélectionnées en tant que récepteurs cellulaires qui, en relation avec les immunoglobulines, seraient engagés dans la défense de l'individu (BODMER, 1972 ; BURNET, 1970).

Les molécules HLA ont des relations structurales avec les immunoglobulines : des chaînes lourdes codées au sein du locus HLA sont associées à des chaînes légères ; ces dernières sont homologues aux domaines constants des immunoglobulines (voir TANIGAKI et PRESSMAN, 1974). L'observation d'une relation évolutive entre la chaîne lourde de la molécule HLA et les différents domaines des immunoglobulines, pourrait se révéler importante. L'interaction entre ces deux types de molécules permet vraisemblablement les contacts cellulaires qui sont à la base de la régulation de la réponse immunitaire et on peut supposer que, parallèlement, à ce qui est observé dans la plupart des structures quaternaires, les complexes qui se forment entre les récepteurs membranaires mettent en jeu des protomères homologues et donc des structures tertiaires apparentées. Par exemple, un oligomère d'Hb est

formé de 4 protomères homologues : 2 Hb α et 2 Hb β ; de la même manière, on a pu montrer que la protéine de transport de la cobalamine et son récepteur de membrane sont homologues (GRASBÉCK et KOUVONEN, 1980). Dans un travail précédent, nous avons montré l'homologie existant entre les domaines constants et variables des immunoglobulines (WUILMART et URBAIN, 1976). Néanmoins, cette homologie n'est apparente que lorsqu'on compare des domaines bien définis, en l'occurrence, le domaine variable V_HIII et le domaine constant C _{μ} 2. Nous en avons donc conclu que ces deux domaines exhibent les séquences d'acides aminés les plus primitives : les plus proches des séquences variable et constante originales.

La chaîne lourde de la molécule HLA peut être subdivisée en 3 domaines : le domaine N terminal (HLA I : résidus 1 à 80) dont une partie de la séquence reflète le polymorphisme du locus HLA : résidus 64-75 (KRANGEL *et al.*, 1980) et les domaines médian (HLA II : 81-182) et C terminal (183-271) qui sont tous deux caractérisés par la présence d'un pont disulfure (ORR *et al.*, 1979). Si l'on choisit une séquence primitive représentative d'un domaine d'immunoglobuline (en l'occurrence V_HIII Tro), on peut montrer par une méthode statistique semblable à celle qui a été décrite dans la première partie de cet exposé, que chacun des 3 différents domaines de la molécule d'HLA est homologue à V_HIII. Néanmoins, la proportion des positions hypervariables (0.3) au sein du domaine variable pourrait influencer la signification statistique de ce résultat. C'est pourquoi, nous avons utilisé un test permettant la mise en évidence des homologies qui pourraient exister entre alignements de séquences ou entre une séquence et un alignement. Une telle méthode a l'avantage de tenir compte de la variabilité propre à chaque position de l'alignement : un acide aminé est comparé à un ensemble d'acides aminés qui sont compatibles avec une structure spatiale bien définie.

Les résultats obtenus en comparant les alignements de 32 domaines V_H et de 17 domaines constants (incluant la β 2 microglobuline) confirment l'existence d'une homologie entre les domaines C et V. Les coordonnées des segments homologues nous ont permis d'aligner les différents domaines V aux différents domaines C ; cet alignement coïncide parfaitement avec ceux qui sont obtenus à partir des modèles cristallographiques des Fab et a une probabilité de 1.1×10^{-4} . Par contre, lorsque les différentes régions constantes sont considérées individuellement et alignées aux 32 domaines V_H, les probabilités

varient de 5.7×10^{-5} pour $C_{\mu}2$ à 1.2×10^{-1} pour $C_{\gamma}2$. Ce super alignement nous a permis de comparer 49 domaines d'immunoglobuline (17C + 32V) à chacun des trois domaines de la chaîne lourde de la molécule HLA. Les résultats obtenus en comparant V_{HIII} Tro aux différents domaines HLA ont ainsi été confirmés ; de plus, les coordonnées des segments homologues nous ont permis d'aligner la portion N terminale de la molécule HLA avec les 32 domaines V_H . On peut ainsi constater que HLA I n'est pas le pendant d'un domaine d'immunoglobuline mais de la moitié d'un domaine. En fait, les résidus 19 à 69 de la molécule HLA sont homologues aux résidus 1 à 56 et aux résidus 64 à 113 du domaine V_H , suggérant que ce dernier est le résultat d'une duplication génétique. Cette homologie est très significative, les probabilités valent 2×10^{-3} lorsque HLA I est aligné avec la région N terminale du domaine V_H et 3.8×10^{-5} lorsque HLA I est aligné avec la région C terminale du domaine V_H . Si HLA I est comparé à un super alignement de 64 séquences (32 V_H N terminale + 32 V_H C terminal), l'alignement a une probabilité de 1.6×10^{-4} ; ce qui suggère bien que le domaine V_H résulte d'une duplication. De plus, l'analyse statistique de l'alignement de 32 séquences V_H montre clairement l'existence de cette duplication : les coordonnées des segments homologues nous donnent un alignement V_H C terminal v_s , V_{HN} terminal qui correspond parfaitement à celui qui est obtenu en comparant HLA I aux domaines V_H ; la probabilité de cet alignement est assez élevée (1.7×10^{-2}), néanmoins, il est à rappeler que les positions hypervariables occupent 50% de cet alignement, si on les enlève, la probabilité est de 2.8×10^{-4} , c'est-à-dire, une valeur comparable à celle qui est obtenue en comparant les régions V aux régions C. L'existence de cette duplication est également soutenue par l'observation du modèle cristallographique du domaine V_H : on constate que les segments β de chacune des deux moitiés coïncident pratiquement et que chacun des deux duplicats exhibe la même «structure tertiaire», les deux «protomères» identiques ayant des orientations opposées (McLACHLAN, 1980).

Les comparaisons de HLA III avec les domaines variables d'une part, et constants, d'autre part, montrent clairement que la région C terminale de la molécule HLA a toutes les caractéristiques d'une région constante d'immunoglobuline. Par contre, les comparaisons de HLA II avec les régions variable et constante des immunoglobulines montrent que HLA II bien qu'homologue aux régions V ou C, doit être

considérée comme un type nouveau de «domaine immunoglobulinique» : les coordonnées des segments homologues nous ont permis de réaligner les positions 83 à 161 de la molécule HLA avec les positions 10 à 81 des domaines V_H ; la probabilité de cet alignement est de 1.2×10^{-4} , ce qui de nouveau correspond aux alignements obtenus entre domaines V et C. Nous voyons donc qu'un gène original d'une cinquantaine d'acides aminés serait à l'origine de la région N terminale de la molécule HLA ; sa duplication et sa diversification aurait conduit à l'apparition des domaines V, C et HLA II.

Cette homologie entre la molécule HLA et les différents domaines d'immunoglobuline est très importante ; on observe en effet, que la «région hypervariable» de la molécule HLA correspond à la deuxième zone hypervariable du domaine V_H. On peut donc supposer que le principe d'une reconnaissance primitive «molécule HLA»-«anti-molécule HLA» a permis, à travers des phénomènes d'hyperduplication, la sélection des reconnaissances immunoglobuline-immunoglobuline ou immunoglobuline-antigène, qui sont à la base de l'expression de la régulation du système immunitaire.

RÉFÉRENCES

- ATASSI (1980). *Molec. and Cell. Biochem.* **32**, 21.
 BODMER (1972). *Nature* 237, 139.
 BONNER, DE MOSS and MILLS (1965) in «Evolving Genes and Proteins» p. 305.
 Eds Bryson and Vogel (Academic Press N.Y.).
 BRADLEY, WOHL and RIEDER (1967). *Science* 157, 1581.
 BURNET (1970). *Nature* 226, 123.
 DAYHOFF (1972) in «Protein Sequence and Structure». Eds National Biomedical Research Foundation. Silver Spring. Maryland.
 DELHAISE, WUILMART, URBAIN (1980). *Eur. J. Biochem.* 105, 553.
 DICKERSON (1971). *J. Mol. Evol.* 1, 26.
 ECK and DAYHOFF (1966). *Science* 152, 363.
 FITCH (1970). *J. Mol. Biol.* 49, 1.
 GRASBECK and KOUVONEN (1980) in «Protides of the Biological Fluids, XXVIII, 4.02.
 KRANGEL, ORR and STROMINGER (1980). *Scand. J. Immunol.* 11, 561.
 LEVITT and GREER (1977). *J. Mol. Biol.* 114, 181.
 McLACHLAN (1971). *J. Mol. Biol.* 61, 409.
 McLACHLAN (1972). *J. Mol. Biol.* 64, 417.
 McLACHLAN (1980) in «Protides of the Biological Fluids, XXVIII, 79.

- ORR, LOPEZ DE CASTRO, PARHAM, PLOEGH and STROMINGER (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4395.
- SALISBURY (1969). *Nature*, 224, 342.
- TANIGAKI and PRESSMAN (1974). *Transpl. Rev.* 21, 15.
- URBAIN (1969). *Biochem. Genet.* 3, 249.
- WEATHERALL and CLEGG (1972) in «Synthesis, Structure and Function of Hemoglobin» p. 237. Eds Martin and Nowicki Lehmann's Verlag Munich.
- WOESE (1971). *J. Theor. Biol.* 33, 29.
- WUILMART, WIJNS, URBAIN (1975). *J. Mol. Evol.* 5, 259.
- WUILMART, URBAIN, GIVOL (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2526.
- WUILMART and URBAIN (1976). *J. Immunogenetics* 3, 1.
- YANOFSKY (1960). *Bact. Rev.* 24, 221.
- YCAS (1972). *J. Mol. Evol.* 2, 17.
- ZUCKERKANDL (1975). *J. Mol. Evol.* 7, 1.
-

Titre III

Stabilité et variabilité de l'information génétique

«Que vous trouviez ou non dépend de votre hypothèse.
C'est la théorie qui détermine l'observation».
Einstein.

PLAN

1. Introduction : Identité et diversité des êtres vivants.
2. L'ADN : support de l'information génétique.
3. Aspects moléculaires de l'action des rayonnements ionisants sur l'ADN.
4. Réplication du message génétique : rôle et fonctions des polymérase de l'ADN.
5. Mécanismes moléculaires de la mutagenèse spontanée et consécutive à l'effet d'agents génotoxiques.
6. Correction post-réplivative des erreurs d'appariement dans l'ADN.
7. Réparation de l'ADN et mutagenèse induite chez la bactérie *Escherichia coli*.
8. Réplication, réparation et mutagenèse de l'ADN dans les cellules de mammifères.
9. De la recherche fondamentale aux applications.
10. Conclusions et perspectives.

CHAPITRE I

1. INTRODUCTION : IDENTITÉ ET DIVERSITÉ DES ÊTRES VIVANTS

M. ERRERA

On est frappé par la diversité des espèces vivantes, qu'elles soient adaptées à la vie aquatique ou terrestre, qu'elles utilisent directement la lumière solaire pour édifier leurs constituants à partir d'eau et de gaz

carbonique ou qu'elles se nourrissent d'autres organismes vivants. C'est cette diversité qui a permis à certaines espèces de résister mieux que d'autres aux changements de conditions extérieures. Au sein d'une catégorie d'individus, cette variété continue à nous surprendre – que de visages, de regards, d'intelligences différents chez l'homme !

Cette multitude de différences entre les espèces et que l'on retrouve parmi les individus qui les composent, résulte de la diversité de l'information génétique portée par l'ADN. Mais l'homme reste humain de génération en génération et des orchidées ne donneront naissance qu'à d'autres orchidées.

Ainsi, paradoxalement, si cette information génétique peut montrer une certaine variabilité au sein d'une même espèce et si, au cours de l'évolution, cette information a évolué lentement et « progressivement », par contre elle est d'une stabilité remarquable dans des limites de temps étroites, ce qui assure aux individus et aux cellules leur identité et leur diversité, leur continuité et leur survie. On est donc amené à rechercher, d'une part, les causes de la stabilité de cette information, mais aussi les mécanismes de sa variabilité.

Augmentation de la quantité d'informations au cours de l'évolution.

Au cours de l'évolution, la quantité d'informations contenues dans l'ADN a augmenté considérablement : de l'ordre de 5×10^6 paires de bases (± 1 millimètre) par cellule, codant pour quelques milliers de protéines chez *E. coli* (une bactérie normale de notre intestin) à 5×10^9 paires (± 1 mètre) par cellule dans une de nos cellules, codant pour plusieurs dizaines de milliers de protéines. Parallèlement à la formation de l'ADN, ont dû se constituer des protéines assurant sa stabilité et son empaquetage, ce qui fut à l'origine des chromosomes tels que nous les connaissons.

Fidélité de la réplication et réparation de l'ADN.

Le maintien de l'intégrité de cette information a nécessité des moyens extrêmement précis pour la transmettre de génération en génération, et notamment des processus de *réplication* extrêmement fidèles. Nous savons aussi que l'ADN est très vulnérable à divers agents externes (rayons ultra-violets du soleil, radiations ionisantes, agents chimiques de l'environnement) et pour protéger cette information, les organismes

ont eu recours à plusieurs stratégies : notamment celle constituée par la double hélice de l'ADN contenant l'information en positif *et* en négatif, la duplication de certaines séquences, la sexualité qui donne à chacune de nos cellules (sauf les cellules sexuelles) un double échantillonnage de chromosomes. Cette série de redondances offrait aux organismes l'assurance de pouvoir survivre en cas de dommages de l'un des deux exemplaires, et elles ont également permis aux cellules de développer des moyens d'éliminer de l'ADN les dommages causés par les agents externes (*Réparation de l'ADN*).

Recombinaison génétique et mutations.

Mais un excès de stabilité génétique n'aurait pas permis l'évolution du monde varié et dynamique que nous connaissons. La sexualité nécessite une étape, la méiose, qui restitue des gamètes ne possédant qu'un seul exemplaire de chaque chromosome. Au cours de la première division méiotique (dite réductionnelle), le patrimoine héréditaire apporté par chacun des parents est le siège d'échanges appelés *recombinaison génétique*. Ceux-ci constituent un facteur de variabilité au sein de l'espèce et un avantage si la combinaison de l'information ainsi créée permet à la descendance de mieux s'adapter au milieu extérieur. Si l'échange est inégal, un (ou des) gène(s) d'un parent peut s'intégrer au génome complet de l'autre et donner à certains gamètes deux exemplaires d'un même gène ; d'autres gamètes seront dans ce cas porteurs de délétions, qui peuvent être défavorables ou même létales. On peut donc supposer que l'accroissement de l'information génétique se soit faite par duplication de gènes au cours des processus sexuels ou par apport de blocs d'information nouvelle venue de l'extérieur (par ex. par des virus, par des organismes symbiotiques, ...). Cet accroissement d'information n'aurait pas pu se faire efficacement par allongement nucléotide par nucléotide – ce qui n'aurait pas augmenté sensiblement la quantité d'informations et n'aurait eu aucun avantage sélectif, et serait donc un gaspillage d'énergie. Des gènes dupliqués sont capables d'être modifiés ponctuellement et d'acquérir des fonctions nouvelles tant que le gène originel permet la survie de l'individu. Cette évolution a permis aux organismes de s'adapter aux changements des conditions de vie. Pour prendre des exemples classiques, les diverses espèces d'hémoglobines permettent aux mammifères d'utiliser au mieux l'oxygène de l'air, à l'état

embryonnaire, foetal ou adulte, aux cétacés d'effecteur des plongées prolongées, ou à certaines oies de survoler l'Himalaya.

Les quatre aspects de la biologie de l'ADN esquissés ici : *réplication*, *réparation*, *mutation* et *recombinaison*, ont certainement évolué simultanément car beaucoup d'enzymes nécessaires à ces fonctions leur sont communes. Ensemble ils constituent les mécanismes fondamentaux de l'évolution des espèces vivantes, mais ils sont aussi essentiels au cours de la vie des organismes pour l'expression de chacune des fonctions qui caractérisent nos cellules, et c'est à ces phénomènes que ce chapitre est consacré. Il résume l'ensemble des recherches du Laboratoire de Biophysique et Radiobiologie.

CHAPITRE II

L'ADN : SUPPORT DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE

P. LECOMTE et O. DOUBLEDAY

On connaît depuis longtemps l'existence des chromosomes et leur doublement, suivi de leur répartition égale dans les cellules filles à chaque division cellulaire. On sait aussi qu'au cours de la formation des cellules sexuelles, leur nombre est réduit de moitié (état haploïde) de manière telle que pendant la fécondation, l'embryon retrouve le nombre double initial (état diploïde). Ce comportement mathématique a permis de leur attribuer un rôle déterminant dans la transmission des caractères héréditaires.

C'est essentiellement à J. Brachet, à l'U.L.B., et à Caspersson, en Suède, au cours de la décennie précédant la dernière guerre mondiale, que l'on doit d'avoir démontré la présence d'acide désoxyribonucléique au sein des chromosomes. A cette époque, la plupart des biologistes pensaient que c'étaient les protéines qui constituent le support de l'information génétique car le DNA semblait disparaître au cours de la formation de certains œufs – comportement incompatible avec une quelconque continuité génétique et c'est à Brachet que l'on doit d'avoir montré qu'en réalité le DNA est dilué dans le noyau de l'ovule et qu'il suffisait de le concentrer par centrifugation pour démontrer sa présence. Mais c'est à Avery et à ses collaborateurs aux U.S.A. que revient la démonstration formelle (1944) que l'ADN est bien le support de l'information génétique. En effet, ils ont montré que, purifié à partir

d'une espèce de pneumocoque, il pouvait être assimilé par une lignée différente de pneumocoque et y exprimer des caractères phénotypiques (propriétés observables d'un organisme) de la lignée donatrice de l'ADN. En 1953, Watson et Crick démontrent que l'ADN est constitué de l'association de deux chaînes polymériques, enroulées l'une autour de l'autre pour former une structure régulière en double hélice (fig. 1). Chacune des chaînes est formée d'un assemblage de quatre nucléotides, ceux-ci résultant de l'association d'un sucre (un désoxyribose) et d'une base purique (adénine, guanine) ou pyrimidique (thymine, cytosine) (fig. 1a). Le sucre de chaque nucléotide est lié au sucre du nucléotide suivant par un groupement phosphate, ce qui constitue le squelette de la molécule d'ADN. Les bases sont empilées les unes sur les autres et sont disposées de façon perpendiculaire à l'axe formé par la molécule d'ADN, chaque pas de la double hélice étant constitué de dix paires de bases.

Les deux chaînes polynucléotidiques associées sont hétérocomplémentaires et il existe entre elles des liaisons appelées «ponts hydrogène» qui se forment entre les bases : la guanine est toujours associée avec la cytosine et la thymine avec l'adénine (fig. 1a et b). On dénombre trois ponts hydrogène entre la guanine et la cytosine et deux ponts entre la thymine et l'adénine. Ces ponts hydrogène sont des forces d'attraction électrostatiques, et leur annulation lors de faibles élévations d'acidité ou de température faibles entraîne la dénaturation de l'ADN, comme l'a démontré R. Thomas (1951, 1953).

Il résulte de cet appariement entre les bases des deux chaînes d'ADN une structure antiparallèle des deux polynucléotides associés. Les chaînes polynucléotidiques possèdent une orientation : elles ont une extrémité 5' phosphate et une extrémité 3' OH (alcool) (fig. 1b, c et d).

Toutes les molécules d'ADN possèdent la même structure de base et sont formées des mêmes éléments. Le squelette (désoxyribose-phosphate) est le même pour toutes les molécules, seule la séquence des quatre bases, c'est-à-dire l'ordre selon lequel ces bases sont agencées, varie d'une molécule d'ADN à l'autre. Bien qu'il n'existe que quatre bases le nombre de combinaisons différentes entre ces dernières est très élevé (pour une molécule de 1000 paires de bases il existe 4^{1000} séquences différentes possibles). C'est dans cet agencement que réside la base moléculaire de l'information génétique. Les cellules somatiques de chacun des organes n'expriment seulement qu'une partie de l'information génétique portée par leurs chromosomes, ce qui donne leur identité

au sang, à la peau, au foie, etc... Nous n'envisagerons pas, dans ce chapitre, les remaniements physiologiques du génome (recombinaison, par ex.) qui caractérisent certaines étapes de l'expression génétique normale, notamment dans le cas de l'apparition de la diversité des anticorps. Ainsi, tout en exprimant fidèlement l'information contenue dans l'ADN, on ne peut considérer celui-ci comme une molécule rigide et de structure immuable, mais au contraire comme une molécule dont la structure est dynamique et constamment remaniée.

CHAPITRE III

ASPECTS MOLÉCULAIRES DE L'ACTION DES RAYONNEMENTS IONISANTS SUR L'ADN

S. GREGOLI

L'homme et les êtres vivants en général sont exposés à l'action d'une série d'agents, naturels ou manufacturés, qui peuvent affecter leur patrimoine génétique. Parmi ces agents mutagènes, les rayonnements ionisants occupent une place dont l'importance ne cesse de croître avec le temps. Pour se protéger des effets nuisibles de l'absorption de rayonnements ionisants, il est important de connaître leur mécanisme d'action. Plus particulièrement, puisque toute l'information génétique nécessaire au fonctionnement correct et à la survie des cellules est contenu dans les molécules d'ADN, il est important de connaître les étapes moléculaires à travers lesquelles l'interaction radiation-ADN aboutit finalement à des effets mutagènes. Les pages qui suivent fournissent un bref aperçu de l'état actuel des connaissances dans ce domaine.

A. Quelques définitions.

On dit qu'une *radiation est ionisante* quand elle est constituée de photons d'énergie suffisamment grande pour provoquer l'éjection d'un électron de la molécule cible, M, et la transformer en une espèce instable, positivement chargée (*cation*) :



L'électron éjecté pourra aussi être capturé par une molécule M qui deviendra chargée négativement (*anion*) :



Les effets primaires de l'action des rayonnements ionisants sur l'espèce moléculaire M peuvent donc être schématisés de la manière suivante :

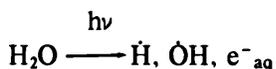


L'éjection ou la capture d'un électron au niveau des orbitales moléculaires externes confèrent à la molécule M une réactivité chimique élevée et une propriété physique très importante : le paramagnétisme. La molécule ainsi modifiée est alors appelée *radical libre* et symbolisée par un point surmontant le symbole de la molécule : \dot{M} . Les deux espèces ioniques M^+ et M^- seront donc plus correctement symbolisées par \dot{M}^+ et \dot{M}^- . La technique qui permet l'étude des radicaux libres est appelée *Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)*. Cette technique permet : (i) de détecter la présence d'espèces radicalaires ; (ii) d'en évaluer la concentration ; (iii) de les identifier et (iv) de remonter aux processus radiochimiques qui les ont formés.

B. Radiolyse d'une solution.

Un premier exemple de modifications chimiques radioinduites est celui de la radiolyse de l'eau. On peut distinguer deux phases :

1) *Phase des produits intermédiaires instables*. Cette phase, achevée en 10^{-11} secondes, aboutit à la création de trois espèces radicalaires principales : atomes d'hydrogène \dot{H} ; radicaux oxhydrils $\dot{O}H$; électrons hydratés e^-_{aq} :



2) *Phase des produits de décomposition stables*. Cette phase, achevée en 10^{-8} sec., résulte de réactions chimiques complexes impliquant les trois produits radicalaires entre eux et aboutissant à la restitution de molécules stables



Lorsque des molécules d'un soluté, M, sont présentes dans une solution aqueuse, il se produit, en même temps que la radiolyse de l'eau, une décomposition chimique de ces molécules. Cette radiolyse du soluté résulte de l'action combinée de deux processus distincts : une *radiolyse directe*, résultant de l'absorption directe d'un quantum de

radiation par la molécule M et une *radiolyse indirecte*, résultant de l'attaque chimique des espèces radicalaires instables produites dans l'eau sur les molécules du soluté intactes. Dans une solution aqueuse, l'importance relative des deux processus radiolytiques, direct et indirect, dépend de plusieurs facteurs, tels que : la concentration de soluté, la présence de capteurs de radicaux spécifiques, la viscosité de la solution, l'état physique de la solution (état liquide, état gelé, état vitreux) etc ...

C. Radiolyse de l'ADN *in vivo* : difficulté d'une approche expérimentale directe.

On sait depuis longtemps que les rayonnements ionisants produisent dans l'ADN irradié *in vivo* deux types principaux de lésions : ruptures de la chaîne polynucléotidique et modifications de la structure chimique des bases. La compréhension des mécanismes moléculaires responsables de ces phénomènes apparaît ardue : les techniques existantes ne permettent pas d'analyse directe *in vivo* car la cellule envoie à l'expérimentateur une multitude de signaux simultanés provenant de tous les constituants cellulaires : ADN, ARN, membranes, protéines, etc. A l'époque actuelle, il est encore impossible d'analyser l'enveloppe de ces signaux en termes des signaux constituants. Le problème de la radiochimie de l'ADN cellulaire se ramène donc à la recherche de systèmes artificiels, techniquement traitables et dans lesquels l'ADN se trouve dans des configurations semblables à celles qu'il possède *in vivo*. Il convient, à ce propos, de faire une brève digression.

Il a été souvent affirmé que : (i) comme la cellule est constituée principalement d'eau, dans la cellule irradiée la quasi-totalité de l'énergie radiante est déposée dans la phase aqueuse. (ii) la radiolyse de l'ADN est donc une radiolyse essentiellement indirecte, c'est-à-dire qu'elle se produit par l'intermédiaire des produits de radiolyse de l'eau. (iii) l'ADN en solution aqueuse diluée représente le système *in vitro* le plus approprié pour une extrapolation des résultats obtenus à la radiolyse *in vivo*. Cette approche méthodologique a influencé la radiochimie pendant des décennies et a orienté massivement la recherche expérimentale dans cette direction. Pourtant, on peut facilement démontrer que ce point de vue est fondamentalement incorrect.

En effet, s'il est vrai que la cellule est constituée principalement d'eau, il est aussi vrai que la plupart de cette eau se trouve dans le cytoplasme, tandis que l'ADN se trouve essentiellement dans le noyau. La séparation physique des deux réactants est telle que les molécules d'ADN sont totalement inaccessibles à la diffusion et à l'attaque chimique des radicaux d'eau produits dans le volume cytoplasmique. L'enchaînement des points (i), (ii), (iii) n'est donc pas logiquement soutenable et tout le problème de la radiolyse de l'ADN *in vivo* doit être ramené à établir quelle est la configuration réelle du système ADN-eau dans le noyau cellulaire.

Dans les cellules de mammifère, la concentration moyenne de l'ADN dans le noyau est de l'ordre de 30-50 mg/ml. Si l'on tient compte des autres substances contenues dans le noyau (ADN, ARN, protéines, etc) la concentration totale du produit sec dans le noyau monte à 150-200 mg/ml. Or, tout biochimiste sait que l'état physique d'un tel système n'est pas celui d'une solution mais celui d'un gel. La radiochimie de l'ADN *in vivo* relève donc de la radiochimie des systèmes hydratés, qui est substantiellement différente de celle des solutions aqueuses diluées.

D. Radiolyse d'un système hydraté;

La différence principale entre une solution et un système hydraté est que, dans ce dernier, une fraction importante de l'eau est liée aux molécules du soluté par des liaisons du type pont hydrogène. Cette eau fortement immobilisée, est appelée *eau d'hydratation*. Dans cette eau aux propriétés physicochimiques très particulières, la diffusion d'éventuels produits de radiolyse est substantiellement perturbée, et parler de «radiolyse indirecte» n'a plus de sens.

Pour revenir à l'ADN, à cause de la présence de groupements polaires dans la macromolécule (en particulier les groupements phosphates situés à l'extérieur de la double hélice : PO₂), la molécule d'ADN est massivement hydratée. L'eau liée remplit les deux sillons de la double hélice et l'enrobe d'une ou de plusieurs couches monomoléculaires. Les effets primaires de l'irradiation de l'ADN cellulaire peuvent donc être schématisés ainsi :

1) Le photon incident est absorbé *par la molécule d'ADN elle-même*. Comme déjà vu, ceci résulte en la formation de radicaux primaires : ADN⁻, ADN⁺.

2) Le photon incident est absorbé *par une molécule d'eau appartenant au volume d'hydratation*. L'ionisation de cette molécule produit aussi deux espèces radicalaires ioniques de signe opposé : $\dot{\text{H}}_2\text{O}^+$, e^- . Toutefois, dans cette eau hautement structurée autour de l'ADN, l'évolution la plus probable de ces espèces ioniques est le transfert de charge vers l'ADN, avec formation de ADN^- et ADN^+ . Pour ce qui concerne les effets radiolytiques, l'ADN hydraté se comporte donc comme une molécule d'ADN sec mais ayant une section efficace approximativement deux fois plus grande.

3) La radiation est absorbée *par l'eau non liée*. Si la première étape radiolytique reste la formation de $\dot{\text{H}}_2\text{O}^+$ et e^- , l'évolution de ces espèces primaires sera la formation de produits intermédiaires instables $\dot{\text{O}}\text{H}$, $\dot{\text{H}}$, e^-_{aq} et leur transformation en produits de décomposition stables tels que H_2 , H_2O_2 . La diffusion des produits radicalaires à travers l'eau d'hydratation et leur éventuelle action sur les molécules d'ADN (radiolyse indirecte) est interdite par la rigidité quasi-cristalline de l'eau d'hydratation.

Pour conclure, il existe dans la cellule deux barrières qui protègent l'ADN de la radiolyse indirecte. La première est la membrane nucléaire (et le confinement spatial de l'ADN dans le noyau) qui exclut toute radiolyse indirecte d'origine cytoplasmique. La seconde est l'eau d'hydratation qui exclut la radiolyse indirecte d'origine nucléaire. On est donc amené à conclure que le processus radiolytique prédominant dans l'ADN irradié *in vivo* est un processus de type direct dont les points d'initiation sont les radicaux ADN^- , ADN^+ . On déduit donc que le système *in vitro* capable de mimer le comportement radiolytique de l'ADN *in vivo* n'est pas la solution aqueuse diluée d'ADN, mais l'ADN sous forme hydratée.

E. Résultats expérimentaux concernant la phase radicalaires de la radiolyse de l'ADN irradié à 77 K sous forme hydratée.

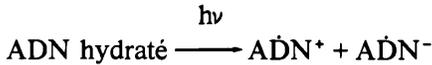
S. GREGOLI, M. OLAST et A. BERTINCHAMPS

L'étude par RPE de la radiolyse de l'ADN et de ses constituants sous forme hydratée constitue le domaine principal de recherche de notre unité.

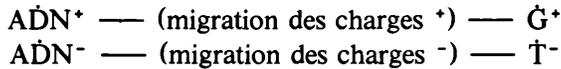
Nous avons étudié des systèmes de complexité croissante : *nucléotides isolés, complexes nucléotidiques de composition et de taille*

différentes et, finalement, la macromolécule *de l'ADN*. Les résultats obtenus tout au long de cette recherche nous ont permis d'élucider les mécanismes radiolytiques moléculaires qui gouvernent les modifications de l'information génétique causée par les radiations ionisantes. Le schéma suivant résume les étapes principales de ce processus complexe.

1) La radiation incidente arrache des électrons à la molécule d'ADN ou aux molécules d'eau contenues dans le volume d'hydratation.



2) Les charges positives (manque d'électron) et les charges négatives (électrons) commencent à migrer : les premières vers les régions les plus nucléophiles, les deuxièmes vers les régions les plus électrophiles de la molécule. Le résultat sera une localisation des charges positives sur les bases guanine G^+ et une localisation des charges négatives sur les bases thymine T^- .



3) Les radicaux cationiques $\dot{\text{G}}^+$ et les radicaux anioniques $\dot{\text{T}}^-$, instables et chimiquement réactifs, vont se transformer en une série de produits de décomposition chimiquement stables, potentiellement mutagènes. La conclusion la plus importante que l'on peut tirer du schéma précédent est que, si les événements primaires provoqués par l'irradiation sont distribués de façon aléatoire, les processus physicochimiques subséquents fixent les lésions de manière préférentielle sur les bases thymine et guanine. Certains auteurs pensent que les ruptures de chaînes de l'ADN provoquées par l'irradiation et qui ont longtemps été considérées comme les lésions principales, se formeraient préférentiellement au voisinage plus ou moins immédiat des radicaux $\dot{\text{G}}^+$.

Il est bien entendu nécessaire d'élargir ce travail à des systèmes encore plus proches de l'état vivant tels que les nucléohistones ou la chromatine. Dans ces systèmes complexes, les molécules d'ADN interagissent intimement avec des agrégats protéiniques hautement structurés et il est important d'établir si la distribution des effets radiochimiques au niveau de l'ADN sont les mêmes ou s'ils sont substantiellement différents de ceux déjà mis en évidence dans la molécule d'ADN isolée.

CHAPITRE IV

RÉPLICATION DU MESSAGE GÉNÉTIQUE : RÔLE ET FONCTIONS DES POLYMÉRASES DE L'ADN

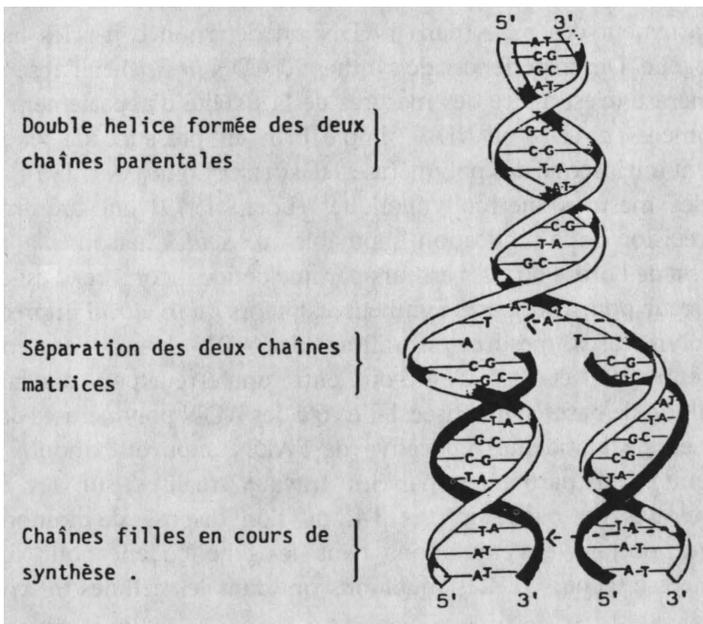
P. LECOMTE et O. DOUBLEDAY

Le caractère essentiel du mécanisme de réplication est d'utiliser simplement la reconnaissance spécifique d'une base par une autre pour construire une séquence nouvelle complémentaire de l'ancienne. C'est cette simplicité qui nous fait croire qu'elle a servi dans les tout premiers systèmes vivants.

(F. Crick)

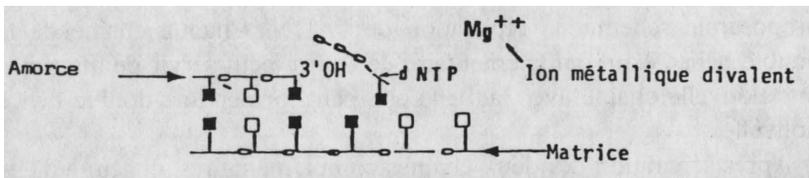
La structure proposée par Watson et Crick a permis à ses auteurs de proposer le schéma de réplication de l'ADN. Chaque chaîne de la double hélice étant complémentaire de l'autre peut servir de matrice à une nouvelle chaîne avec laquelle elle peut former une double hélice nouvelle.

Après séparation des deux chaînes complémentaires, chacune d'elle sert de matrice pour la synthèse d'une nouvelle chaîne complémentaire, la polymérisation se faisant dans le sens 5' → 3'.



Les polymérases de l'ADN sont les enzymes qui réalisent la synthèse de l'ADN, donc doublent et conservent l'intégrité de l'ADN, permettant ainsi le transfert du matériel génétique au cours des générations de cellules.

Cette synthèse semi-conservative s'effectue en associant entre eux des désoxynucléosides triphosphates dits «précurseurs» (dNTP). Pour que le processus de polymérisation s'installe, trois facteurs principaux sont requis : 1) une matrice (l'ADN simple brin) qui, pour pouvoir être répliquée, doit être associée à un petit fragment d'ADN «initiateur» complémentaire (l'amorce) auquel s'accroche le précurseur de manière séquentielle ; 2) les quatre désoxyribonucléosides triphosphate précurseurs (dNTPs) ; 3) un ion métallique divalent, en règle générale le magnésium (Mg^{++}).



On peut se demander comment les polymérases réalisent une duplication aussi exacte des molécules d'ADN. On sait que la spécificité d'appariement des bases dans l'ADN est déterminée par les liaisons hydrogène. Des expériences de synthèse d'ADN *in vitro* en l'absence de polymérase (c'est-à-dire des mesures de la fidélité d'appariement entre monomères d'ADN et ADN simple brin en présence de zinc, ion divalent intrinsèque des polymérases) (ORGEL et LOHRMANN, 1974), ainsi que des mesures thermodynamiques (LOEB, 1979) ont montré que l'imprécision de la réplication imputable *aux seules* liaisons d'appariement est de l'ordre de 10^{-2} erreurs par nucléotide incorporé (c'est-à-dire une erreur pour cent bases synthétisées), alors qu'*in vitro* l'imprécision des polymérases, mesurée en utilisant des ADN de séquence connue varie entre 10^{-4} et 10^{-6} (c'est-à-dire entre une erreur pour dix mille et un million de bases synthétisées). Le rôle des ADN polymérases dans le maintien de la fidélité répliquative de l'ADN a pu être montré sans ambiguïté, en particulier par les travaux réalisés sur les ADN polymérases du bactériophage T4, où l'on dispose de nombreuses souches portant des mutations dans le gène codant pour l'ADN polymérase (gène 43). Ces mutations ont dans les cellules (*in vivo*) et

expérimentalement (*in vitro*) des effets importants sur la fidélité répliquative de l'ADN (GILLIN et NOSSAL, 1975).

Principaux mécanismes permettant le maintien de la fidélité répliquative de l'ADN au cours de sa duplication par les polymérasés

Il existe principalement deux grands types d'ADN polymérasés. Les unes ne possèdent qu'une seule fonction, celle de polymériser ; c'est le cas des polymérasés de cellules supérieures, comme les polymérasés α et β . D'autres possèdent en plus de cette fonction de polymérisation, une ou deux fonctions associées. Celles-ci peuvent dégrader l'ADN simple ou double brin dans le sens $3' \rightarrow 5'$ ou encore dans le sens $5' \rightarrow 3'$ dans le cas d'ADN double brin. On a par exemple dans cette deuxième catégorie d'ADN polymérasés, les polymérasés I et III d'E. coli, la polymérase du phage T4 et la polymérase α d'un champignon.

Deux étapes du processus de polymérisation sont déterminantes pour assurer le maintien de la fidélité répliquative :

- 1) La sélection de la base complémentaire à la base de la matrice ;
- 2) L'élimination en cas d'erreur de la base mal appariée.

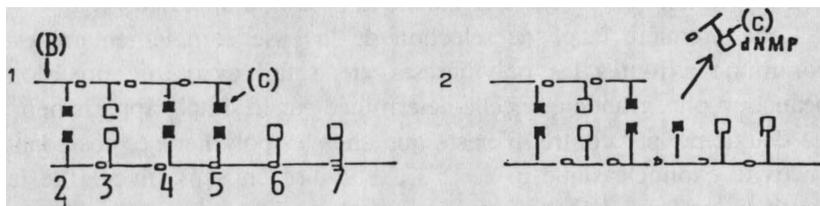
Cette première étape de sélection de la base complémentaire est commune à toutes les polymérasés et se fait avec une précision beaucoup plus grande que celle déterminée par le simple appariement. La deuxième, par contre, n'existe que chez les polymérasés possédant l'activité exonucléasique $3' \rightarrow 5'$, c'est-à-dire en sens inverse de la synthèse ; celle-ci élimine spécifiquement les bases mal appariées au cours de la polymérisation, corrigeant ainsi les erreurs de répliquaison (GALLAS et BRANSCOMB, 1978). Grâce à l'existence d'enzymes affectés par mutation dans cette fonction exonucléasique $3' \rightarrow 5'$ (mutants du bactériophage T4), il a été montré que cette activité enzymatique de correction, aussi désignée sous le terme «proofreading» (correction d'épreuve), joue un rôle fondamental dans le maintien de la fidélité répliquative (GOODMAN, 1972 et 1979 ; BRUTLAG et KORNBERG, 1972).

Si ce mécanisme de correction est assez bien compris, les mécanismes impliqués dans la sélection des bases restent quelque peu obscurs. Nous avons dit plus haut que le processus de la polymérisation ne peut avoir lieu qu'en présence d'un ion métallique divalent, préférentiellement le magnésium ; si on le remplace par un autre ion divalent tel le manganèse, le cobalt ou le beryllium dans la réaction de polymérisation, on observe une diminution de la fidélité répliquative : les polymérasés discriminent moins efficacement entre désoxyribonucléo-

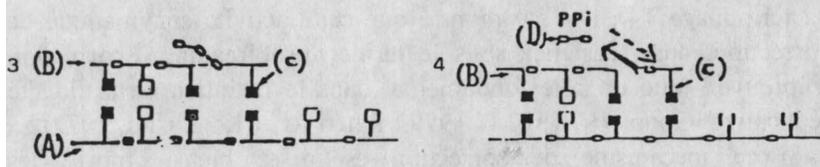
tides complémentaires et non complémentaires à la matrice (SIROVER et LOEB, 1976 ; MIYAKI *et al*, 1977 ; RADMAN *et al*, 1977). Il existe encore d'autres réactions qui accompagnent le processus de synthèse de l'ADN. Pour faciliter la compréhension de ces différentes réactions, nous nous aiderons des schémas suivants :

1) L'excision des bases non complémentaires (BRUTLAG et KORNBERG)

En 1. est représentée l'incorporation d'une nouvelle base (C) dans la chaîne en élévation (B), l'enzyme passe alors à la base matrice suivante (position 6) ; la complémentarité des bases est symbolisée par une couleur commune (noir ou blanc). Si la base incorporée est incorrecte (non complémentaire) elle peut (si la polymérase possède une fonction exonucléasique 3' → 5') être éliminée sous la forme de désoxynucléoside monophosphate (dNMP). Cette situation est schématisée dans le diagramme 2. où (C) représente le monophosphate excisé. Cette fonction peut être spécifiquement inhibée par une forte concentration de désoxyribonucléosides monophosphates.



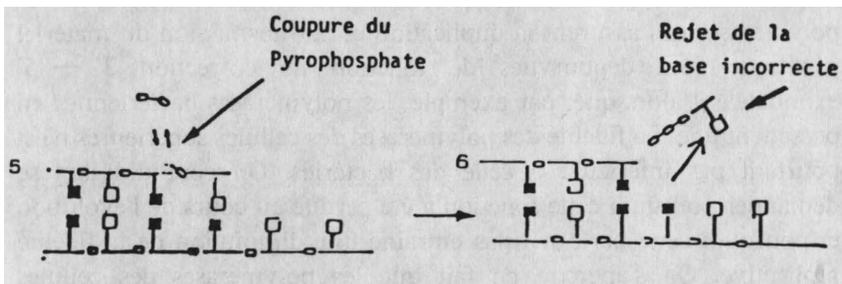
2) L'échange de pyrophosphate (LECOMTE et RADMAN)



En 3. est représentée une molécule d'ADN matrice (A), initiée par un petit fragment d'ADN (B) ; en (C) est représenté le désoxyribonucléoside triphosphate dNTP non encore incorporé dans la molécule d'ADN. En 4. est schématisée la base complémentaire (C) à la matrice qui n'est pas encore définitivement liée au brin d'ADN en cours de synthèse. En (D) sont représentés les deux phosphates PPi (appelés

pyrophosphate) provenant du triphosphate précurseur. Cette réaction de clivage du pyrophosphate à partir du triphosphate par l'ADN polymérase est une réaction *réversible* si on ajoute un grand excès de pyrophosphate dans la réaction. Dans ce cas, la base (C) redevient un triphosphate. C'est cette réaction réverse qui est désignée sous le terme d'échange de pyrophosphate ; elle semble essentielle pour la sélection des bases par le complexe enzyme-matrice.

Après clivage du pyrophosphate, l'enzyme contre-sélectionne les bases non complémentaires en rejetant la base erronée, non sous la forme d'un monophosphate, comme c'est le cas pour la fonction 3' → 5' exonucléasique, mais sous la forme d'un triphosphate qui peut être réutilisé (5 et 6).

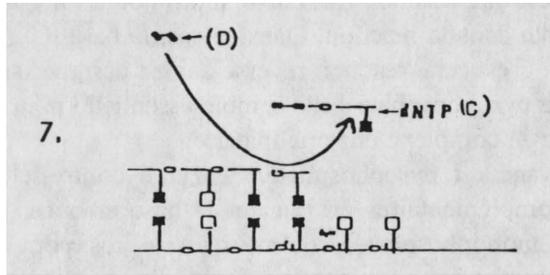


Nous avons, dans ce cas, le même produit à la fin de la réaction qu'au départ, ce qui est très économique pour la polymérase qui ne consomme pas de triphosphate. Ce mécanisme de rejet est fortement altéré par l'ion manganèse, ce qui lui confère son caractère mutagène et cancérigène.

3) La pyrophosphorolyse (KORNBERG)

Il existe enfin une autre réaction qui peut être effectuée par les ADN polymérases : c'est la pyrophosphorolyse qui est la réaction réverse de la polymérisation. Elle est représentée en 7. et dégrade l'ADN en présence d'une forte concentration de pyrophosphate PPi (D) pour engendrer des triphosphates (C). Mais elle n'a lieu que si les triphosphates sont absents du milieu réactionnel au début de l'expérience et diffère de l'échange de pyrophosphates puisqu'elle engendre des triphosphates à partir de l'ADN. La correction des erreurs de répliation faite par les polymérases dépourvues de fonction 3' → 5' exonucléase ne peut pas résulter de la pyrophosphorolyse, comme on l'a longtemps cru, car cette réaction de dégradation du brin

d'ADN néosynthétisé ne peut s'effectuer que sur les bases complémentaires à la matrice.



Il est intéressant de noter que, dans les cellules supérieures, les polymérase qui assurent la duplication et la transmission du matériel génétique sont dépourvues de fonction de correction 3' → 5' exonucléase, alors que, par exemple, les polymérase bactériennes en possèdent une. La fidélité des polymérase des cellules supérieures n'est pourtant pas inférieure à celle des bactéries. On peut dès lors se demander pourquoi cette fonction a été perdue au cours de l'évolution et pourquoi cette perte n'a pas entraîné une diminution de la fidélité répliquative. On s'aperçoit en fait que les polymérase des cellules supérieures ont développé une autre stratégie, qui consiste à *diminuer la vitesse de répliquative de l'ADN* (qui peut être cent fois inférieure chez les cellules supérieures que chez les bactéries). Cette diminution de vitesse s'accompagne d'une très forte augmentation de la fidélité de l'enzyme. Le ralentissement de la polymérisation permet à l'enzyme de faire une sélection des bases beaucoup plus précise puisque celle-ci dispose de plus de temps pour rejeter des bases non complémentaires. Un gros avantage par rapport à la fonction 3' → 5' exonucléasique est donc l'économie réalisée par l'enzyme puisqu'elle ne consomme pas de triphosphates.

Nous avons succinctement décrit quel était le support de l'information génétique et comment elle se transmettait au cours des générations. Les mécanismes moléculaires qui permettent aux ADN polymérase de maintenir l'intégrité du patrimoine génétique, bien que très efficaces et très sophistiqués, ne sont toutefois pas suffisants pour empêcher toutes les erreurs répliquatives. Pour corriger les erreurs résiduelles faites par les polymérase, les cellules ont développé une série de *mécanismes de correction postrépliquatifs de l'ADN*.

CHAPITRE V

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE LA MUTAGÉNÈSE SPONTANÉE ET CONSÉCUTIVE À L'EFFET D'AGENTS GÉNOTOXIQUES

P. LECOMTE, O. DOUBLEDAY

«L'évolution procède comme un bricoleur qui pendant des millions et des millions d'années remanierait lentement son œuvre, la retouchant sans cesse, coupant ici, allongeant là, saisissant toutes les occasions d'ajuster, de transformer, de créer.»

F. Jacob.

A. Mutagénèse spontanée

Nous avons expliqué sommairement quels étaient les mécanismes prépondérants pour le maintien de la fidélité de la réplication de l'ADN par les ADN-polymérase (sélection de la base complémentaire à la base matrice, élimination après incorporation des bases malappariées par excision ou échange de pyrophosphates). Si un de ces mécanismes est déficient, une erreur non corrigée a pour conséquence d'altérer l'information génétique et, de ce fait, engendre l'apparition de mutations. Ce type d'erreur qui peut se produire au cours de la réplication normale de l'ADN est un événement qui a lieu très rarement (une fois sur dix millions) et qui, étant donné sa faible fréquence, n'a que peu de conséquences immédiates sur l'organisme. Toutefois, quand une lésion subsiste dans l'ADN lors de la réplication, une mutation peut être fixée dans l'ADN et être transmise à la descendance.

Mutagénèse par les agents génotoxiques.

Il existe de nombreux agents génotoxiques dans notre environnement, par exemple, les radiations et les composés chimiques cancérigènes, qui peuvent altérer l'information génétique. Ils modifient la structure fine de l'ADN ; par exemple, en ajoutant un groupement chimique à une base, ils peuvent changer la spécificité d'appariement de cette base. Ces modifications des bases de l'ADN peuvent, lors de la réplication de ce dernier, être à l'origine d'une mutation qui se

transmettra au cours des générations. Ce qui est remarquable c'est que les mutations induites par les agents externes ne diffèrent pas essentiellement des mutations spontanées.

B. Types de Mutations

– *mutations par substitution de bases*. La plupart des mutations proviennent du remplacement d'une paire de bases par une autre paire de bases (AT — GC) ; ce type de mutation peut réverser vers la séquence originelle par une deuxième mutation en sens inverse. D'une manière générale, on appelle *transition* une mutation résultant de la substitution d'une purine (ou pyrimidine) par une autre purine (ou pyrimidine) et *transversion* celle d'une purine par une pyrimidine et vice versa.

– *mutations par perte ou addition de bases*. Il existe une deuxième catégorie de mutation résultant de l'addition ou de la perte d'une ou de plusieurs paires de bases. Ceci peut se passer lors de la réplication de séquences répétitives de l'ADN (par exemple plusieurs paires GC qui se suivent). L'enzyme peut alors déraiper et sauter ou ajouter une ou plusieurs bases. Ce type d'erreur augmente fortement lorsque certaines drogues s'intercalent entre deux paires de bases. S'il manque ou s'il s'ajoute 1 ou 2 bases, le texte génétique constitué de triplets sera déphasé et le message transcrit n'aura plus de signification au-delà de ce codon : la protéine synthétisée ne sera pas fonctionnelle. Si la délétion ou l'addition concerne trois nucléotides, il manquera un acide aminé (ou il y en aura un de trop) ; la protéine formée ne sera pas nécessairement inactive. Dans le cas de délétion importante dans la séquence nucléotidique, revenir à la séquence d'origine est très peu probable.

– *remaniements chromosomiques*. Il existe une série de mutations, dites chromosomiques, qui se caractérisent par des déplacements de morceaux d'ADN, plutôt que par des modifications de séquences, bien que les deux puissent exister simultanément. Il s'agit d'échanges, de duplications, d'inversions qui sont régis par le système de *recombinaison génétique*. Il peut en résulter des échanges «légitimes», ou «illégitimes» (entre séquences homologues, ou non) ; dans ce dernier cas, ils peuvent s'accompagner d'aberrations de chromosomes, dont certaines sont viables et d'autres létales ; nous n'aurons pas l'occasion de les décrire ici.

C. Lésions de l'ADN mal codantes et non codantes

En dehors des ruptures de l'une ou des deux chaînes de l'ADN, les lésions peuvent être classées en deux grandes catégories :

1) les lésions mal codantes qui modifient légèrement la spécificité d'appariement des bases de la matrice ;

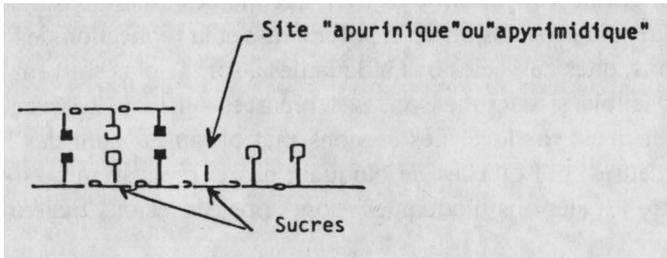
2) les lésions non codantes qui changent très fortement la structure des bases qui ne s'apparient plus avec aucune des quatre bases et de ce fait bloquent la progression de la polymérase et la réplication de l'ADN. Ces lésions, dites aussi «lésions bloquantes», sont le plus souvent létales pour la cellule si elles ne sont pas réparées ou si le blocage de la réplication n'est pas levé. Les «lésions mal codantes» sont des lésions dites mineures, puisqu'elles ne bloquent pas la réplication de l'ADN ; par contre les «lésions bloquantes» sont appelées lésions majeures.

D. Comportement des ADN polymérases au cours de la réplication au niveau de lésions ou de bases anormales

a. Nous avons étudié notamment l'effet mutagène de la 2-aminopurine, de la bromodéoxyuridine, qui sont respectivement des bases analogues à l'adénine et à la thymine. Ces analogues peuvent être confondus par les enzymes cellulaires et prendre la place de la base normale, mais leur complémentarité avec les bases normales étant moins spécifique, elles provoquent des *mutations par transition*.

b. Le chlorure de vinyle monomère est utilisé comme point de départ pour la synthèse du PVC (chlorure de polyvinyle) fabriqué industriellement en grande quantité. On sait que le chlorure de vinyle, une fois activé et métabolisé par la cellule, produit des dérivés qui possèdent un fort pouvoir cancérigène. On peut démontrer que les dérivés étudiés réagissent avec l'ADN, en particulier, avec l'adénine et la cytosine qui, modifiées, s'apparient respectivement avec la guanine (au lieu de la thymine) et avec la thymine (au lieu de la guanine). Ils provoquent donc des *mutations de type transversion*, et résultent de lésions malcodantes. En plus de leur pouvoir mutagène, on peut montrer que ces dérivés du chlorure de vinyle inhibent assez fortement la réplication de l'ADN ce qui suggère que certaines lésions sont non codantes. Ces résultats permettent de penser que ces altérations de l'intégrité de l'ADN pourraient représenter l'une des étapes initiales du processus de la cancérogénèse due au chlorure de vinyle. (BARBIN, BARTSCH, LECOMTE et RADMAN).

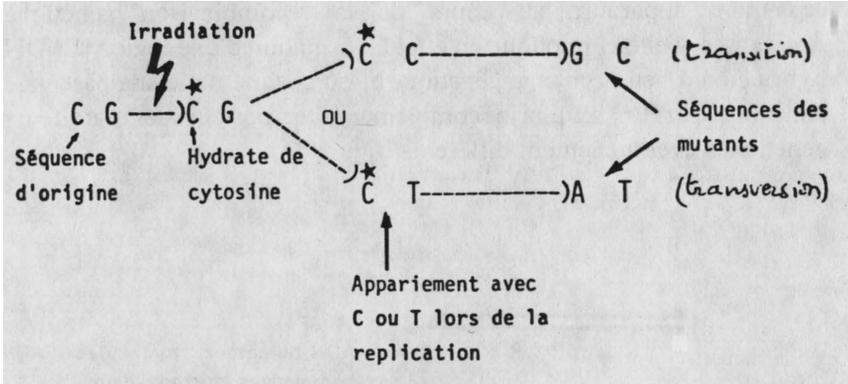
c. *Certaines altérations chimiques ou enzymatiques* d'une base peuvent entraîner sa perte (il s'en produit même spontanément dans les cellules) et laisser un *site apurinique ou apyrimidique*, où seul le squelette sucre phosphate est conservé. Ces lésions peuvent être réparées, et dans ce cas elles sont mutagènes ; si elles ne sont pas répliquées elles seront létales.



Ces sites, en condition normale de synthèse, ne peuvent pas être répliqués et arrêtent la progression de l'enzyme ; ces lésions sont de ce fait non codantes ; si elles sont portées par un bactériophage, elles peuvent être répliquées dans une bactérie irradiée aux U.V. où les fonctions SOS (voir section 7B) mutagènes ont été induites. De même, en altérant la sélection des bases par les polymérase, en remplaçant par exemple le manganèse par le magnésium, elles deviennent capables de répliquer ces sites. D'une façon assez surprenante, malgré l'absence de base dans la matrice, l'enzyme sélectionne à cet endroit la base pour laquelle il a la plus forte spécificité et il peut répliquer face à une lésion non codante.

d. En plus des dimères de pyrimidines, le *rayonnement UV* provoque la formation d'un grand nombre de lésions mal codantes qui pourraient expliquer une partie des mutations observées chez les cellules survivantes. Une même lésion peut posséder comme nous venons de le voir différentes propriétés d'appariement selon les conditions de répllication utilisées dans l'essai. Par exemple aussi, les hydrates de cytosine qui sont formés lors de l'irradiation par les rayons ultraviolets et gamma codent normalement de façon très efficace pour la cytosine et quelque peu pour la thymine. Si on inhibe la fonction 3' → 5' exonucléasique de l'ADN polymérase utilisée, on peut en face de cette lésion, incorporer très efficacement la thymine ou même la guanine. En général, il semble que l'altération de la sélection des bases

par la polymérase conduit à des changements dans la spécificité des mutations provoquées par une même lésion dans la matrice, qui peut donc donner naissance à deux mutations différentes.



Non seulement, la lésion elle-même détermine la spécificité de la ou des mutations, mais aussi l'enzyme n'est pas neutre et peut modifier le type de mutation obtenue (LECOMTE *et al*, 1981).

CHAPITRE VI

CORRECTION POST-RÉPLICATIVE DES ERREURS D'APPARIEMENT DE L'ADN

F. BOURGUIGNON-VAN HOREN et G. MAENHAUT-MICHEL

«La théorie de la survie du plus apte de Darwin est en réalité un cas particulier d'une loi plus générale de la survie du plus stable».

(R. Dawkins).

1. *Existence d'un mécanisme enzymatique capable de reconnaître et de corriger spécifiquement dans l'ADN des séquences de bases non complémentaires*

Au niveau moléculaire, une mutation résulte souvent de la présence d'une base non complémentaire à celle de la matrice, introduite au

cours de la réplication et non corrigée par l'ADN-polymérase elle-même (voir paragraphe 4). L'introduction d'une base non complémentaire, ou chimiquement modifiée, entraîne un mauvais appariement local des deux brins d'ADN. De tels mésappariements peuvent également apparaître au cours de la recombinaison génétique généralisée. Celle-ci implique en effet la formation d'une région d'ADN hybride où a lieu l'échange génétique et où chaque molécule parentale contribue par un seul brin complémentaire, porteur de marqueurs génétiques éventuellement différents (figure 1).

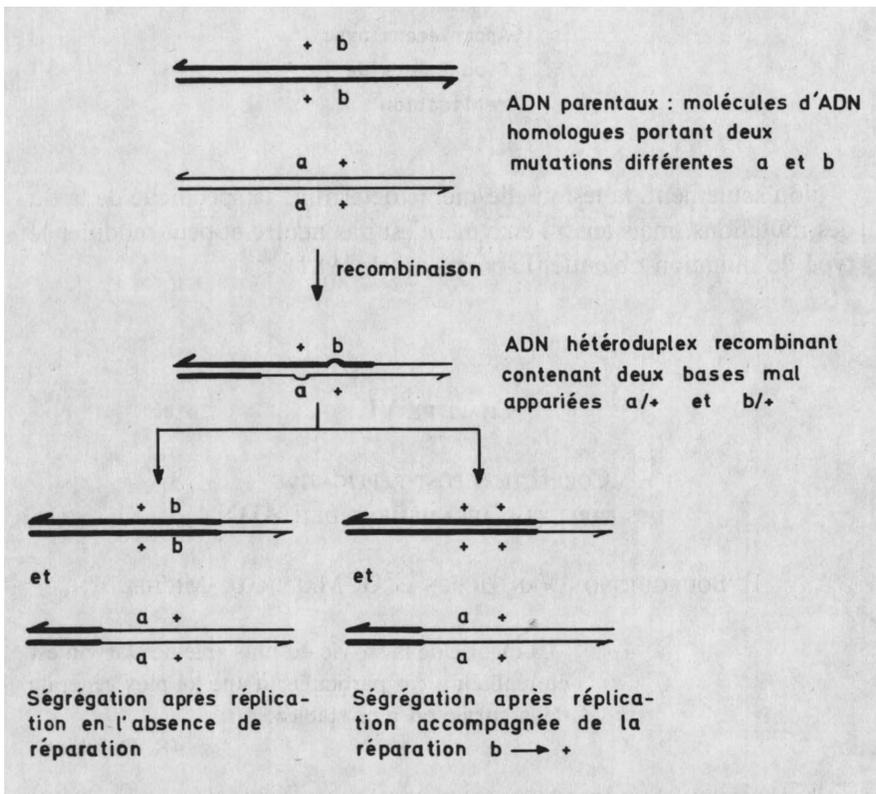


FIGURE 1.- Ségrégation des éléments d'un hétéroduplex formé par recombinaison accompagnée ou non de réparation des régions mal appariées (le sens de la flèche indique la polarité du brin d'ADN). (d'après J. D. WATSON, dans *Biologie Moléculaire du Gène*, p. 269, Interéditions, Paris 5°).

L'existence d'un mécanisme de correction des régions mal appariées dans l'ADN a été initialement suggérée pour expliquer le processus de *conversion de gènes* chez les eucaryotes (HOLLIDAY, 1964 ; WAGNER et MESELSON, 1976), ainsi que l'apparition chez le bactériophage λ d'un excès de recombinants formés entre des marqueurs génétiques très proches (haute interférence négative). On a émis l'hypothèse (RADDING, 1978) que ces génotypes recombinants résulteraient d'une correction des mésappariements dans la molécule d'ADN hybride où a lieu la recombinaison plutôt que de vrais échanges de matériel génétique appelés enjambements ou «cross over». (Ceux-ci donnent en effet une fréquence de recombinaison entre deux marqueurs génétiques d'autant plus élevée que la distance entre les marqueurs est grande). Nous avons apporté des arguments expérimentaux en faveur de cette interprétation en montrant qu'il y a diminution de la haute interférence négative chez le bactériophage λ pour des marqueurs proches lorsque le croisement des bactériophages «parentaux» se fait dans des souches de bactéries qui sont déficientes en mécanisme de correction des mésappariements (mutants d'E. coli *mut L* et *mut S*) (BOURGUIGNON-VAN HOREN, F. *et al.*, 1982).

Au cours de la réplication, la correction des zones mal appariées de l'ADN s'opérerait par des enzymes de type endo-exonucléolytique, qui exciseraient les nucléotides mal appariés exclusivement à partir du brin néosynthétisé contenant l'erreur et resynthétiseraient le fragment excisé en prenant la fibre d'ADN parentale exacte comme modèle (figure 2 A, B, C). Un tel système de réparation agissant après la réplication doit pouvoir faire la discrimination entre le brin d'ADN parental et la fibre néosynthétisée contenant la base erronée. S'il n'en était pas ainsi, l'excision porterait de façon aléatoire sur l'un ou l'autre brin et pourrait ôter la base correcte, aussi bien que l'incorrecte, fixant ainsi la mutation (figure 2 X, Y).

2. Rôle de la méthylation des bases de l'ADN dans la correction des erreurs d'appariement.

En 1976, Wagner et Meselson ont suggéré que la discrimination entre brin parental et brin néosynthétisé pourrait se faire grâce à l'état de non méthylation transitoire du brin d'ADN nouvellement formé. La présence dans l'ADN de bases portant un groupe méthyl (CH_3) a été découverte il y a environ 30 ans déjà (HOTCHKISS, 1948) et, depuis lors, a été démontrée pour une large variété d'organismes procaryotes et

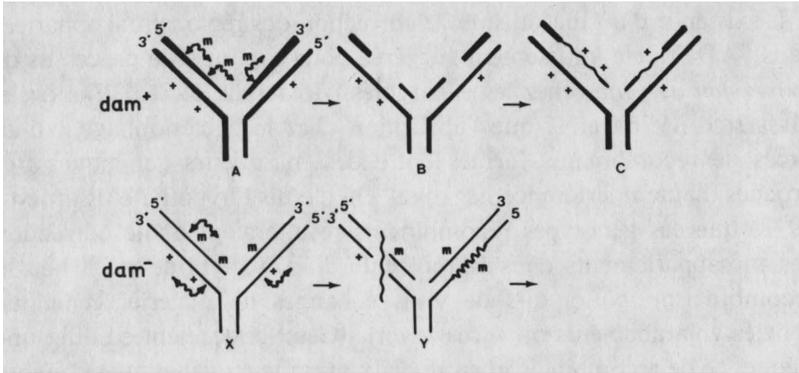


FIGURE 2.— Modèle de la réparation des régions mal appariées de l'ADN en fonction de la méthylation des brins et interprétation possible des propriétés des bactéries *E. coli dam⁻* (déficient for adenine methylation)

L'épaisseur des brins d'ADN correspond à leur degré de méthylation. *m* représente une erreur de réplication ou l'introduction d'un analogue de base, entraînant un mauvais appariement dans la double hélice.

A et B : Incision par les enzymes endonucléolytiques (flèches perpendiculaires aux brins d'ADN) et excision exonucléolytique des régions mal appariées (direction de l'excision représentée par les lignes ondulées parallèles aux brins d'ADN) de façon préférentielle à partir des brins néosynthétisés d'ADN sous-méthylés.

C : Resynthèse des régions excisées, donnant lieu à une molécule d'ADN exempte de mutation.

X : Situation en l'absence de méthylation de l'ADN, par exemple dans *E. coli dam⁻* : les enzymes endo-exonucléolytiques agissent aussi bien sur le brin parental que sur le brin néosynthétisé.

Y : Le bras gauche de la fourche répliquative montre une rupture de la double hélice due à un chevauchement des régions excisées à partir des brins d'ADN complémentaires. Le bras droit illustre le cas où les enzymes de réparation des mésappariements fixent une mutation plutôt que de la corriger.

Les situations décrites en Y expliqueraient plusieurs phénotypes des bactéries *E. coli dam⁻*, notamment leur caractère spontanément mutateur et leur sensibilité accrue aux analogues de base.

eucaryotes, tant dans le règne animal que végétal (HALL, 1971). Le pourcentage de bases méthylées dans l'ADN est relativement important : par exemple dans l'ADN des cellules d'eucaryotes (*), 2 à 7% de la totalité des cytosines est modifiée en 5-méthylcytosine, le degré de méthylation variant selon l'espèce. Chez les procaryotes(**) par

(*) Cellules contenant un noyau et des chromosomes (de la levure aux organismes supérieurs).

(**) Cellules sans noyau à DNA non structuré en chromosomes (bactéries).

contre, on trouve essentiellement la 6-méthyladénine et pas ou peu de 5-méthylcytosine. On a pu montrer que le processus de méthylation suit la progression du complexe réplicatif, de sorte que la fibre néosynthétisée est, pendant une brève période, non méthylée par rapport à la fibre parentale. La méthylation se fait directement sur les bases déjà incorporées dans l'ADN, par une ou plusieurs enzymes, appelées méthylases.

L'universalité de la présence de bases méthylées dans l'ADN, la spécificité des séquences soumises à la méthylation et la répartition non aléatoire des séquences méthylées le long de l'ADN suggèrent fortement que la méthylation de l'ADN joue un rôle biologique important. Des résultats expérimentaux récents tendent à démontrer que chez les vertébrés la méthylation de l'ADN est un élément clé dans les mécanismes de contrôle de l'activité des gènes et de la différenciation (pour revue, RAZIN et FRIEDMAN, 1981). Chez les procaryotes, elle agirait au niveau de la recombinaison et comme nous l'avons montré au niveau de la mutagenèse (pour revue, BOURGUIGNON-VAN HOREN *et al.*, 1982).

En 1973, Marinus et Morris ont isolé des mutants de *E. coli* qui présentent une méthylation réduite des adénines (*dam*⁻) ou des cytosines (*dcm*⁻) de l'ADN parce qu'ils sont déficients en enzymes de méthylation. Entre autres propriétés, ces mutants présentent un *taux accru de mutations spontanées* et une plus grande *sensibilité aux UV* (*) ainsi qu'aux agents mutagènes (agents alkylants, analogues de bases). La comparaison de ces phénotypes, en particulier le caractère spontanément mutateur semblable à ceux de mutants mutateurs connus (TIRALY et FOX, 1973 ; NEVERS et SPATZ, 1975) (probablement déficients en enzymes de correction des régions mal appariées de l'ADN) a conduit Meselson, Wagner et Radman (1980) à émettre l'idée que les enzymes de correction des erreurs introduites lors de la réplication utiliseraient la sous-méthylation transitoire de l'ADN nouvellement synthétisé comme moyen de discrimination entre fibre parentale et fibre nouvelle. Sur la base de cette hypothèse, les auteurs ont proposé un schéma qui pourrait expliquer la plupart des effets pleiotropiques de la mutation *dam*⁻ (Figure 2). En l'absence de méthylation, donc de moyen de discrimination, les enzymes de correction des régions mal appariées incisent au hasard l'une ou l'autre fibre de l'ADN et fixent

(*) UV = rayons ultraviolets.

ainsi un certain nombre d'erreurs de réplication. Dans le cas de nombreux mésappariements, une activité enzymatique portant sur les deux brins opposés d'ADN entraîne un chevauchement des régions excisées et donc des ruptures de la double hélice de l'ADN. Ceci expliquerait par exemple la létalité accrue de *E. coli dam*⁻ en présence d'analogues de base.

4. Mise en évidence expérimentale de la correction dirigée des régions mal appariées de l'ADN chez *Escherichia coli*.

Pour simuler le segment d'ADN situé près de la fourche réplivative chez une bactérie *E. coli* de type sauvage, nous avons construit des molécules d'ADN hétéroduplex de bactériophages lambda (λ) dont l'un (ou l'autre) des brins est méthylé, et qui portent des régions mal appariées génétiquement connues. Un ADN hétéroduplex est une molécule double brin formée par la réassociation des fibres issues de deux molécules génétiquement et/ou physiquement différentes. Dans le cas du bactériophage λ , les brins d'ADN dissociés par la chaleur peuvent être purifiés puis réassociés spécifiquement l'un avec l'autre pour constituer des molécules hétéroduplex où les marqueurs génétiques et/ou physiques sont connus par rapport à la polarité des brins. Les molécules d'ADN phagiques (homo- ou hétéroduplex) peuvent être introduites dans des bactéries dont les parois ont été rendues perméables aux acides nucléiques (processus de transfection), et ainsi donner lieu à une production de phages dont les caractères génétiques peuvent être analysés, soit au niveau du lysat total, soit au niveau de la production individuelle des bactéries (centre infectieux).

Si la correction des mésappariements porte sélectivement sur l'ADN sous-méthylé, on doit s'attendre à une perte préférentielle des marqueurs portés par la fibre *me*⁻ non méthylée dans un hétéroduplex *me*⁺/*me*⁻ ou *me*⁻/*me*⁺. On observe effectivement un biais important dans le recouvrement des marqueurs parentaux en faveur du génotype méthylé (*me*⁺) (RADMAN *et al*, 1980). Pour pouvoir affirmer que le biais lié à la méthylation est provoqué par le mécanisme de réparation des mésappariements, il convenait de réaliser des expériences de transfection dans des bactéries déficientes en enzymes de correction. Nous avons démontré que le biais lié à la méthylation des brins observé normalement dans le recouvrement des marqueurs génétiques est aboli dans les mutants *mutH*, *L*, *S*. De plus, on constate que le nombre de centres infectieux où sont présents simultanément des phages porteurs

de l'un et l'autre des marqueurs génétiques de la molécule hétéroduplexe, y est plus important que celui relevé lors de la transfection des bactéries de type sauvage. Ces résultats confirment le rôle de la méthylation des adénines de l'ADN bactérien dans la correction des régions mal appariées et par conséquent dans le maintien de la stabilité génétique (RADMAN *et al.*, 1981).

Les travaux de notre groupe ont permis de préciser le mode d'action d'un système enzymatique de correction des bases mal appariées dans l'ADN bactérien. Ce mécanisme diminuerait la mutagenèse spontanée des bactéries en excisant les erreurs de réplication introduites dans la fibre nouvellement synthétisée. Il serait également capable de réparer certaines lésions spécifiques atteignant les bases, telles qu'une modification chimique de celles-ci ou leur remplacement par des analogues, et agirait ainsi également sur la mutagenèse induite.

CHAPITRE VII

RÉPARATION DE L'ADN ET MUTAGÈNESE INDUITE CHEZ LA BACTÉRIE *ESCHERICHIA COLI*

P. CAILLET-FAUQUET et A. BROTCORNE

Nous avons vu que la stabilité génétique dépend de la correction d'erreurs apparues au cours de la réplication de l'ADN. Mais de nombreux agents extérieurs peuvent venir altérer le message porté par l'ADN. Des mécanismes de réparation de lésions provoquées par des agents extérieurs sont apparus tôt dans l'évolution, de manière à préserver l'information génétique, mais nous verrons aussi que certaines formes de réparation sont productrices de mutations, donc de variabilité génétique.

A. La réparation de l'ADN

Les lésions peuvent être éliminées de l'ADN, soit directement (réparation pré-répllicative), soit après réplication des fibres endommagées (réparation post-répllicative).

1) réparation pré-répllicative.

La réparation pré-répllicative s'effectue principalement de deux manières :

1.) par réversion des lésions

La *photoréactivation* est la réparation spécifique des dimères de pyrimidine (Py Py), créés par les rayons ultraviolets (UV) (KELNER, 1949). L'enzyme de photoréactivation utilise l'énergie fournie par la lumière visible qui monomérisent le dimère in situ : les cellules ainsi réactivées survivent, ce qui démontre le rôle létal des dimères de pyrimidines.

La *transalkylation* permet la réversion d'une guanine alkylée (par ex. modifiée par méthylation sur l'oxygène 6) ; il y a un simple transfert du groupe alkyle sur une protéine réceptrice, la guanine se retrouvant alors à son état normal (OLSON et LINDAHL, 1980).

2.) par excision de nucléotides ou de bases

Ce mécanisme repose sur la complémentarité des deux chaînes de l'ADN. Les radiations (ou agents chimiques) n'endommagent généralement qu'une des deux fibres en un même site de l'ADN, la structure correcte de l'ADN peut être restaurée par excision du segment endommagé et resynthèse du tronçon manquant, conformément à la séquence de bases de la chaîne complémentaire intacte. On connaît actuellement deux modes de réparation par excision. Dans le cas des dimères de pyrimidines, l'excision se fait grâce à une série d'enzymes qui coupent et éliminent une partie de la fibre d'ADN lésée, dans la direction 5' → 3'. La polymérase I effectue cette dégradation et peut synthétiser «simultanément» la nouvelle portion d'ADN sur le modèle de la chaîne complémentaire intacte. L'intégrité de la molécule est restaurée par la ligase qui rétablit la continuité de l'ADN.

L'efficacité de l'excision peut être énorme. Des cellules de mammifères peuvent «supporter», peut-être en les excisant tous, de l'ordre de 10^6 dimères, mais cela reste une proportion assez dérisoire des $5 \cdot 10^9$ paires de bases susceptibles d'être endommagées de l'ADN total.

Cette même succession d'événements s'observe lors de l'élimination de sites apurinique et apyrimidique (Ap) apparus dans l'ADN, soit spontanément, soit sous l'action d'enzymes spécifiques, souvent lorsqu'une base purique ou pyrimidique a subi un dommage chimique ou physique.

3.) réparation des ruptures de chaînes.

Les ruptures de chaînes de l'ADN peuvent être resoudées par des mécanismes plus ou moins compliqués dont certains sont pré-réplcatifs.

II) Réparation post-réplcative.

Lors de la *réplication de l'ADN*, il peut subsister dans la matrice des dommages non réparés (ou atteints par le complexe réplcatif avant réparation). Suivant la nature des lésions, la synthèse de l'ADN peut se poursuivre et mettre une base en face de ces lésions. C'est le cas des lésions *mal codantes*, altérations mineures, ne bloquant pas la réplication, mais modifiant les propriétés de complémentarité des bases (voir paragr. 4 sur la fidélité de la réplication) (ici fig. 1, molécule A). Si la lésion est importante, par exemple un dimère de pyrimidine ou le produit de l'addition d'un agent mutagène/cancérogène volumineux, l'ADN polymérase est bloquée par la lésion. On dit que la lésion est *non codante*. La polymérase finit par se détacher, elle reprend son activité en aval, à un nouveau site d'initiation (à partir d'une amorce d'ARN) (fig. 1, molécule b).

La réparation post-réplcative répare cette interruption et laisse la lésion primitive dans la chaîne parentale. L'interruption dans le nouveau brin synthétisé est létale, mais elle peut être réparée de deux manières :

1) réparation post-réplcative par recombinaison (RUPP et HOWARD-FLANDERS) :

Cette brèche peut être réparée en prélevant le segment manquant dans la chaîne parentale de même polarité (fig. 1, molécule C). La nouvelle brèche formée dans cette dernière chaîne est comblée et resoudée par l'ADN-polymérase et la ligase (fig. 1, molécule d).

Lorsqu'une lésion non codante est localisée soit (i) dans des brèches chevauchantes formées par l'excision de lésions ou lors de la réplication de l'ADN lésé non encore réparé, soit (ii) dans un ADN simple brin, la réparation par recombinaison ne peut s'effectuer, et on devrait s'attendre dans ces conditions à la mort de la cellule. La seule possibilité de survie qu'aurait alors la cellule est de posséder un mécanisme de réparation permettant une resynthèse en face des lésions (fig. 1, molécule e).

2) réparation SOS : inductible et mutagène.

En 1974, M. Radman a proposé l'hypothèse selon laquelle le blocage de la réplication par des lésions déformantes non réparées subsistant

REPARATION et MUTAGENESE

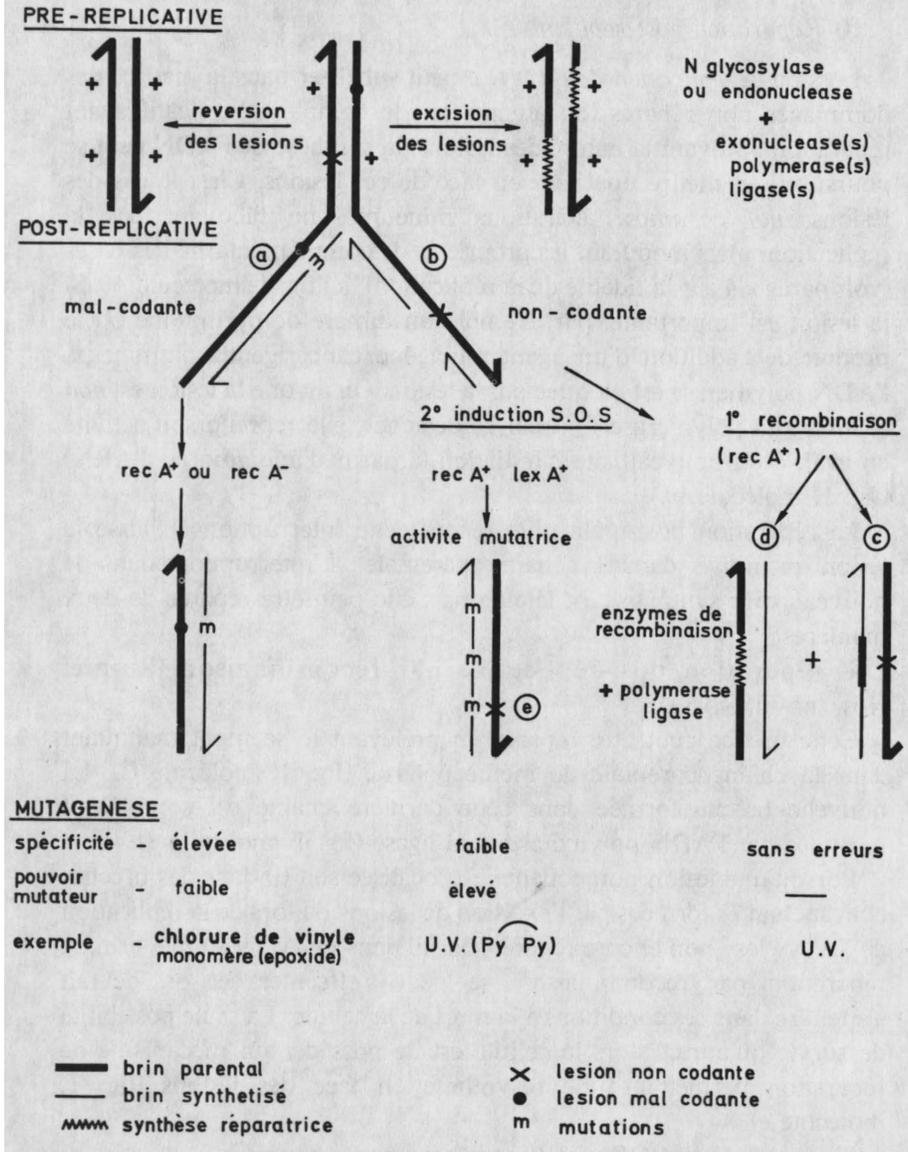


FIGURE 1.

dans l'ADN produit dans la cellule un «signal de détresse» (SOS) qui activerait une série de gènes. Ces gènes contrôlés de manière coordonnée sont responsables d'une réparation mutagène de l'ADN (réparation SOS), de l'inhibition de la division cellulaire, de l'induction de prophage dans des cellules contenant de l'ADN de phage intégré dans l'ADN bactérien et de toute une série d'autres fonctions (appelées fonctions SOS) induites, en réponse à ces lésions.

B. Mécanismes de la réparation SOS

La première observation ayant conduit à l'hypothèse SOS a été faite par WEIGLE (1953) : l'irradiation d'une bactérie hôte avant l'infection par un bactériophage irradié accroît parallèlement la survie et la mutagenèse du phage. En 1971, DEFAIS *et al* ont observé une corrélation entre l'induction du prophage (passage de l'état de prophage au cycle lytique du phage), la «Weigle-réactivation» et la «Weigle-mutagenèse» du phage irradié. Ils ont supposé que ces différents phénomènes, qui sont tous supprimés par des mutations dans les mêmes gènes bactériens *recA* et *lexA*, devaient posséder dans leurs mécanismes d'induction des étapes communes.

a) Rôle des gènes *recA* et *lexA* dans l'induction des fonctions SOS.

Le contrôle des fonctions SOS par les gènes *recA* et *lexA* peut être schématisé sur la base du modèle classique de régulation d'un gène. (voir Fig. 2).

Lorsque la synthèse de l'ADN est bloquée, par exemple par des lésions non codantes, la protéine RecA est activée (Fig. 2) et acquiert en plus de sa fonction principale qui est de se lier à l'ADN, une activité protéasique (c'est-à-dire la capacité de dégrader des protéines). Jusqu'à présent, on sait que deux protéines sont clivées par cette activité protéasique induite, le répresseur du bactériophage λ (ROBERTS & ROBERTS, 1975) et le produit du gène *lexA* (LITTLE *et al*, 1980). (fig. 2).

En clivant la protéine LexA, la protéine RecA augmente sa propre synthèse. Cependant la régulation de *recA* par *lexA* ne suffit pas à expliquer le contrôle des multiples gènes qui codent pour d'autres fonctions SOS. Certains de ces gènes sont déjà connus : par exemple celui (ceux) responsable(s) de l'arrêt de la division cellulaire (une des fonctions SOS) et les gènes (*uvrA*) et (*uvrB*) qui codent pour une endonucléase intervenant dans la réparation par excision. En plus, le

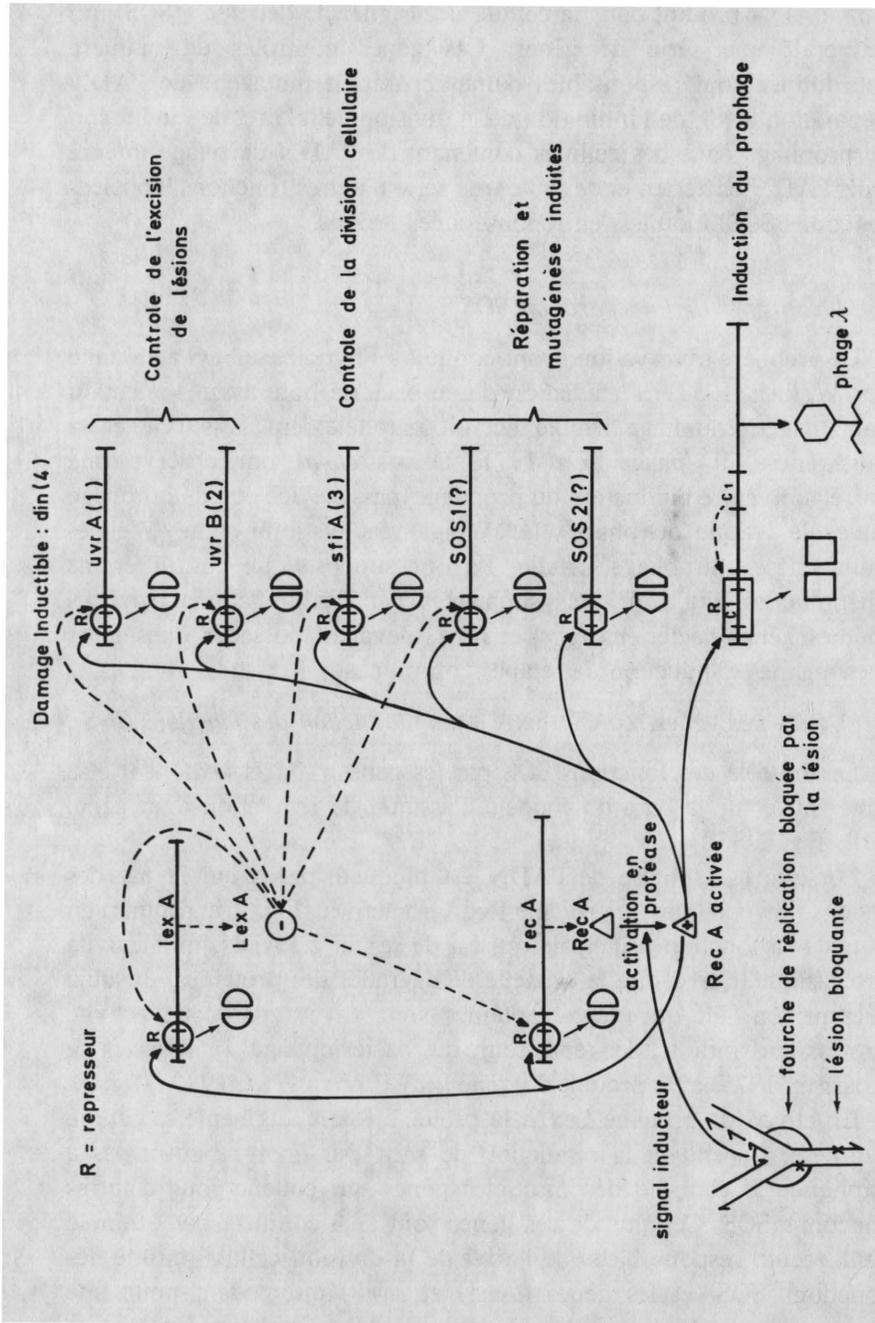


FIGURE 2.

gène *lexA* lui-même est rétrocontrôlé par son propre produit (voir fig. 2). On sait en outre que toute une série d'autres gènes, non encore identifiés, sont induits par les rayons UV.

En conclusion, le gène *recA* apparaît comme un activateur des fonctions SOS et le gène *lexA* comme un inhibiteur de ces fonctions : ils contrôlent un ensemble de fonctions impliquées dans la réparation de l'ADN, l'intégration d'un virus (bactériophage), la croissance cellulaire, la recombinaison génétique. Une lésion non codante, bloquant la synthèse de l'ADN, induit les fonctions SOS de manière transitoire (par ex. : pour la Weigle mutagénèse du phage irradié, la mutagénèse retombe au niveau initial au bout d'une heure environ). L'induction peut être également obtenue sans lésion dans l'ADN, par exemple en inactivant une protéine nécessaire à sa réplication. Il s'agit typiquement d'un *processus épigénétique* (voir définition chapitre «Du virus au mammifère» par R. THOMAS, p. 19). Comme nous le verrons plus loin, l'induction des fonctions SOS peut avoir des *conséquences génétiques* (puisque l'une des fonctions induites est mutagène créant des mutations (héréditaires) même dans un ADN intact).

b) Mécanisme moléculaire de la réparation SOS mutagène induite.

La réparation mutagène SOS peut également agir sur des phages à simple brin d'ADN. L'emploi d'un système bactérie/phage permet de dissocier la réponse cellulaire (induction SOS) du comportement de l'ADN viral irradié ou non. La Fig. 3 résume le cas du phage irradié aux UV, cultivé sur des bactéries intactes ou irradiées aux UV. La production de virus nécessite la formation d'un ADN double brin et cette synthèse est représentée par une flèche. On voit immédiatement que les lésions (x) bloquent la réplication quand la bactérie est intacte. Le virus ne se développe pas, il est tué et ne peut être le siège de mutations. Mais si la bactérie a été également irradiée (induction SOS) une fraction significative des molécules d'ADN viral est complètement répliquée (Fig. 3c) : le phage survit et est le siège de mutations ; cette réparation mutagène (SOS) pourrait résulter de la reprise de la synthèse de l'ADN qui franchirait alors les lésions sans discontinuité.

Rôle de l'ADN polymérase

On peut démontrer dans des systèmes expérimentaux artificiels, que lorsque la réplication est bloquée, les précurseurs (dNTP) continuent à être consommés et sont transformés en mononucléotides et en

pyrophosphate : l'ADN polymérase «piétine» et tout se passe comme si toutes les bases qu'elle essaye d'introduire face à la lésion ne conviennent pas et sont continuellement «corrigées» et éliminées par la fonction 3' — 5' exonucléase. C'est cette activité qui inhiberait la progression de l'ADN polymérase ; elle pourrait être modifiée par l'induction SOS, ce qui permettrait à la réplication de se poursuivre. Cependant, l'analyse biochimique de l'étendue de la synthèse d'ADN irradié, effectuée *in vitro* par des ADN polymérases ne possédant pas d'activité de correction (par ex. l'ADN polymérase α des cellules eukaryotes), suggère que l'inhibition de l'activité 3' — 5' exonucléasique ne serait pas suffisante pour permettre au complexe réplcatif de copier de l'ADN contenant des lésions importantes telles que les dimères de pyrimidine (DOUBLEDAY *et al*, 1981).

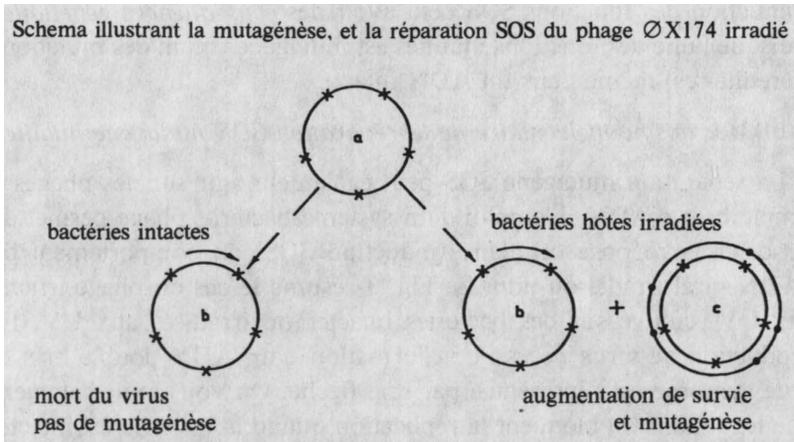


FIGURE 3.— Réplication partielle (b) et totale (c) d'un phage ϕ X174 irradié aux UV l'insertion de bases complémentaire ou non en face des dimères (x) ou/et ailleurs (.) dans l'ADN.

Caractérisation des mutations SOS observées dans l'ADN lésé ou dans un ADN intact

L'un des faits fondamentaux révélés par l'étude de la mutagénèse SOS est que l'irradiation bactérienne entraîne des mutations non seulement dans le bactériophage irradié, mais aussi dans du

bactériophage intact : il s'agit donc d'une diminution de la fidélité de la réplication de l'ADN.

L'utilisation du bactériophage M13 (qui a été complètement séquencé) nous a permis d'étudier le type de mutations dues aux lésions dans l'ADN (phages irradiés), ou les changements de bases engendrés par l'effet mutateur proprement dit de la réparation SOS, c'est-à-dire les mutations créées dans l'ADN intact (phages non irradiés). Comme le phage M13 est un phage à simple brin d'ADN, il est possible d'identifier sans ambiguïté les changements de base(s) impliquée(s) dans la modification de la séquence en un site (T-T-A-G) où l'irradiation aux UV peut créer des dimères dans l'ADN phagique. Connaissant le changement de la séquence de base (mutation ponctuelle) qui entraîne l'inhibition de la croissance du phage M13, nous avons étudié pour les deux types de mutagenèse (lésions ou effets mutateurs) les modifications de la séquence mutée (voir Fig. 4).

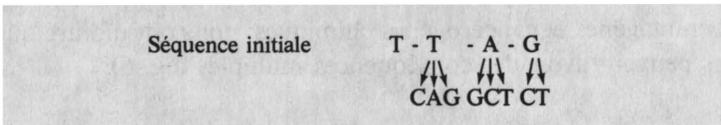


FIGURE 4.- Changement de bases qui restaurent la croissance du phage.

Brandenburger et coll. ont observés des transitions et des transversions indifféremment pour toutes les bases de la séquence envisagée. On ne constate donc pas de spécificité manifeste de la mutagenèse, ni en cas d'induction de l'effet mutateur de la réparation SOS, ni en cas d'irradiation de l'ADN cible. De plus, l'effet de l'irradiation aux UV de l'ADN cible (phage M13) sur la *distribution* des modifications de la séquence des bases montre que, dans ce système, les dimères de pyrimidines ne sont pas le site préférentiel de changement dans la séquence des bases (c'est-à-dire qu'il n'y donc de spécificité, ni de mutagenèse ni de site). Nous savons que les dimères de pyrimidine représentent la majorité des lésions létales causées par l'irradiation de phage simple brin. Les expériences de Weigle et de Witkin (1953 et 1966) ont montré que les dimères seraient des lésions majeures nécessaires à l'induction du système SOS. En fait, la comparaison, effectuée récemment, entre les effets multiples (par ex. mutagenèse, survie du phage ØX174) d'irradiations de types variés, montre que les

lésions UV sont réparées plus efficacement, mais se révèlent moins mutagènes que celles qui sont provoquées par les radiations ionisantes (YAKAGAI *et al.*, 1981). Ces résultats font apparaître qu'il n'existe pas de corrélation simple entre le caractère létal, l'aptitude à être réparé ou le pouvoir mutateur des différentes lésions (radio)-induites dans l'ADN, bien que leur pouvoir mutateur dépende principalement de l'induction SOS.

III. Relation entre le cancer et les effets génétiques et épigénétiques des lésions induites dans l'ADN.

L'importance fondamentale des lésions de l'ADN semble actuellement de plus en plus évidente dans la production de cancers. Il reste cependant à déterminer lequel des effets spécifiques des lésions subsistant dans l'ADN constitue l'événement responsable de la cancérogénèse. Les études, réalisées sur les *procaryotes*, des mécanismes cellulaires induits par l'irradiation UV, X, γ , ou par la majorité des agents mutagènes et cancérogènes chimiques, nous ont montré que les lésions peuvent avoir des conséquences multiples (fig. 5).

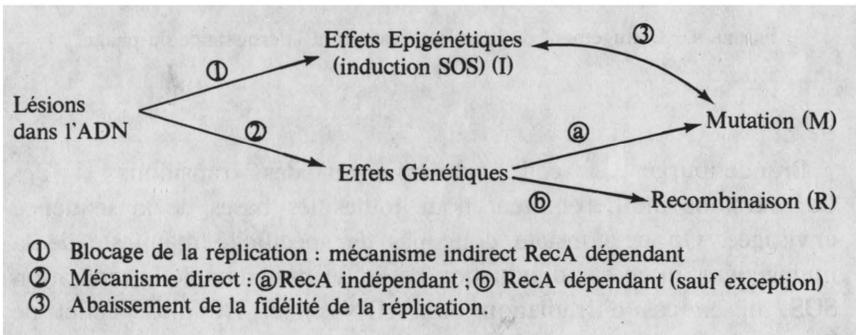


FIGURE 5

1^o) les effets épigénétiques (ou induction SOS) impliquent des changements dans le contrôle de l'activité des gènes ; ils peuvent éventuellement avoir des conséquences génétiques, c'est-à-dire modifier de manière stable l'expression de certains gènes. Comme nous l'avons vu, l'effet mutagène des UV dépend de l'induction SOS, qui chez la bactérie est de courte durée et n'est pas nécessairement causée par une lésion de l'ADN (voir Titre VII et le chapitre «Du virus au mammifère : la logique de la régulation» par R. Thomas).

2°) les *effets génétiques* (mutation (M) ou recombinaison (R)). Les mutations consistent en des changements héréditaires dans la séquence des nucléotides. Elles peuvent être dues aux erreurs apparues lors de la réplication de l'ADN, lors de sa réparation, ou à des altérations mineures d'une base, modifiant ses propriétés de complémentarité, mais ne bloquant pas l'ADN polymérase (réplicase). Dans le cas de l'Induction SOS, les effets génétiques résultent d'un abaissement de la fidélité de la réplication que l'ADN soit lésé ou pas.

Les *recombinaisons* peuvent se définir comme des échanges physiques entre des fragments d'ADN, donnant souvent lieu à de nouvelles unions entre des séquences pré-existantes. Par exemple, on peut observer des remaniements chromosomiques, des recombinaisons homologues ou non homologues. Les effets génétiques sont spécifiques d'un chromosome ou même d'un locus génétique et ils n'affectent qu'une petite partie de la population exposée. Il est probable que la cancérogénèse requiert la coïncidence de changements génétiques et épigénétiques dans la cellule (RADMAN *et al*, 1982). On sait que l'*initiation* de la cancérogénèse est due à un changement chromosomique stable et héréditaire au niveau cellulaire (peut-être une mutation ponctuelle ou un remaniement chromosomique). La *promotion* cancérogène (CAIRNS, 1981) est un processus épigénétique : une cellule ne devient cancéreuse que si elle a subi ces deux événements, dans l'ordre, initiation puis promotion. Il a été suggéré et partiellement démontré que les agents cancérogènes complets provoquent des effets génétiques et épigénétiques (PIETRAPAULO, 1981) et peuvent aussi causer des remaniements chromosomiques spécifiques (KINSELLA et RADMAN, 1980), tandis que des initiateurs «purs» ne provoquent que des mutations (transition, transversion, petites délétions ou addition).

Nous verrons dans le paragraphe 9 qu'il est possible d'après ces données théoriques de proposer un test pratique qui devrait non seulement permettre de connaître rapidement le mode d'action de certains agents cancérogènes mais probablement aussi de prévoir leur puissance cancérogène.

CHAPITRE VIII

RÉPLICATION, RÉPARATION ET MUTAGÉNÈSE DE L'ADN DANS LES CELLULES DE MAMMIFÈRES

J. ROMMELAERE et J. CORNELIS

A. Réparation préréplicative des lésions induites dans l'ADN

La lumière ultraviolette artificielle ou solaire provoque la formation de dimères de pyrimidine dans l'ADN des cellules de la peau humaine. D'autres lésions sont induites par des agents mutagènes/cancérogènes physiques ou chimiques susceptibles d'agresser également les cellules internes de l'organisme. Comme chez les bactéries et les levures, les dommages induits dans l'ADN des cellules supérieures peuvent être réparés avant la réplication, par les mécanismes déjà décrits : la *photoréactivation* enzymatique, l'*excision* et la *soudure des cassures* de l'ADN.

Nous avons pu étudier le devenir des dimères de pyrimidine en utilisant des anticorps dressés spécifiquement contre ces lésions. Ces anticorps permettent de doser les dommages présents dans des cellules irradiées et de suivre ainsi les processus de réparation de l'ADN. Ce procédé permet de mettre en évidence la réversion des dimères de pyrimidine par la *photoréactivation* enzymatique, chez les protozoaires ainsi que dans les cellules de bactériens, d'oiseaux et de marsupiaux ; toutefois, ce mécanisme ne semble pas, ou peu, actif dans les cellules de mammifères placentaires, ce qui contribue à rendre la peau humaine sensible aux rayons du soleil. Par contre, la *réparation par excision* existe dans toutes les cellules que nous avons étudiées, à l'exception de celles prélevées chez les rongeurs. Ici, l'étape limitant l'excision semble être l'incision de la chaîne nucléotidique endommagée : en effet, on peut montrer que des traitements inducteurs de cassures de l'ADN permettent l'élimination des dimères voisins dans ces cellules.

Les lésions provoquées par le rayonnement UV de la lumière solaire sont mutagènes et ces mutations pourraient être impliquées dans l'initiation des cancers de la peau. Ainsi, l'on a constaté que la fréquence de ce type de cancer s'est accrue chez les scandinaves qui passent leurs vacances au bord de la Méditerranée. Il existe chez l'homme un syndrome héréditaire, Xeroderma pigmentosum, caracté-

risé par une incidence anormalement élevée de cancers de la peau. Ce syndrome illustre l'importance de la réparation par excision chez l'homme. Les cellules de la peau de ces patients sont en effet incapables d'exciser les dimères de pyrimidines qui y sont induits par la lumière solaire. Chez les individus normaux, par contre, l'excision des lésions est efficace et semble reconstituer fidèlement l'intégrité de la séquence d'ADN, diminuant ainsi le risque de mutations et peut-être de cancers. Il existe plusieurs autres *maladies humaines héréditaires* qui s'accompagnent d'une *sensibilité anormale aux radiations et à divers agents chimiques* cancérigènes : heureusement ces maladies sont rares (de l'ordre de quelques cas par 10.000 à 100.000 personnes). Mais l'existence même de ces cas démontre l'efficacité de la réparation de l'ADN chez les personnes normales exposées à ces agents.

La réparation par excision n'élimine toutefois pas la totalité des lésions. Les cellules humaines excisent au mieux la moitié des dimères de pyrimidine qui sont formés dans leur génome, et chez les rongeurs, la majorité des dommages induits persistent apparemment dans le noyau des cellules (bien que peut-être sous forme modifiée). L'effet de ces lésions résiduelles sur la réplication de l'ADN fait l'objet du paragraphe suivant.

B. *Réplication de l'ADN dans les cellules de mammifères exposées à des agents génotoxiques physiques et chimiques*

La plupart des agents qui provoquent des mutations modifient les bases de l'ADN. La relation entre ces lésions et la mutagenèse n'est toutefois pas claire. Certaines *lésions* sont qualifiées de *prémutagènes* : les mutations sont au moins en partie fixées dans les séquences complémentaires aux lésions *mal codantes* lors de la réplication de l'ADN. En outre, certaines lésions peuvent apparemment modifier ou déclencher une ou des fonctions cellulaires responsables de l'introduction de mutations en d'autres sites, éventuellement non lésés, de l'ADN. Cet *effet mutagène indirect* n'est pas sans rappeler le phénomène de mutagenèse SOS induite chez les bactéries bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas nécessairement identiques. Afin d'éclaircir la relation entre les mutations et les dommages de l'ADN, il est essentiel de déterminer l'effet de ces derniers sur la réplication de l'ADN.

Les agents génotoxiques chimiques et physiques inhibent souvent temporairement la synthèse de l'ADN. Le génome cellulaire, chez le

mammifère, est divisé en de multiples unités dont la réplication est initiée individuellement et séquentiellement. L'une des causes de l'inhibition de la synthèse de l'ADN dans les cellules exposées est le retard de l'*initiation de la réplication* dans les unités qui doivent se répliquer peu après l'apparition des lésions. Une autre cause de cette inhibition par certaines lésions est le blocage de l'*élongation des brins* de l'ADN en voie de synthèse. Par exemple, les dimères de pyrimidine empêchent la progression de la «machinerie répliquative». Il s'en suit que la longueur (poids moléculaire) des chaînes d'ADN synthétisées immédiatement après le traitement des cellules par divers agents génotoxiques, est inférieure à celle trouvée dans les cellules contrôles. Après une dizaine d'heures, la cellule redevient toutefois capable de synthétiser de l'ADN de haut poids moléculaire et en quantité comparable à celle des cellules non traitées. Ceci ne résulte pas simplement de l'excision des lésions primaires, ni de réarrangements entre molécules d'ADN qui permettent d'«esquiver» les blocs de réplication. Il semble plutôt que les lésions perdent au cours du temps leur pouvoir de bloquer l'élongation des chaînes en croissance. Cette récupération pourrait résulter d'une modification de la lésion elle-même ou du mécanisme de sa réplication.

L'analyse de la réplication de l'ADN dans les cellules de mammifères est complexe et souvent difficile à interpréter, du fait de l'existence de multiples unités de réplication dans chaque chromosome. Aussi, cette analyse est-elle facilitée par l'emploi de virus qui sont constitués d'une seule unité de réplication et qui utilisent les enzymes cellulaires. Ces virus sont d'excellentes sondes qui témoignent des activités répliquatives de leurs cellules-hôtes et qui permettent une analyse biochimique simplifiée des formes intermédiaires de l'ADN en voie de réplication. C'est ainsi que nous avons pu démontrer l'interférence des lésions avec l'élongation du brin néosynthétisé grâce à l'emploi d'un petit virus à ADN simple brin appartenant au groupe des *Parvovirus* (voir encadré). Le génome des parvovirus est constitué d'un seul brin d'ADN dont l'extrémité 3' renferme une séquence autoccomplémentaire (palindrome) susceptible d'adopter une configuration en épingle à cheveux (). L'amplification de l'ADN parvoviral requiert la conversion de ce mono-brin en une forme répliquative bicaténaire. Cette conversion résulte de l'élongation continue et unidirectionnelle du palindrome 3' terminal qui sert d'amorce et d'origine unique de réplication (). A ce titre, le génome des Parvovirus constitue un substrat particulière-

ment adapté à l'étude de la synthèse d'ADN face à une matrice endommagée par divers agents. Il est par exemple apparu que certaines lésions provoquées par la lumière UV bloquent irréversiblement l'élongation de l'ADN du virus. En outre, l'exposition des cellules hôtes à des doses non létales de lumière UV (ou de certains agents chimiques) une douzaine d'heures avant l'infection virale, accroît leur capacité de répliquer l'ADN viral. Ceci suggère que l'inhibition de la réplication de l'ADN par ces agents pourrait être en partie compensée par l'activation, par ces mêmes agents, de système(s) enzymatique(s) permettant une reprise de la synthèse.

Les parvovirus sont *les plus petits virus d'animaux* connus. La taille de la particule virale, 20 millièmes de millimètres, est voisine de celle du ribosome. Le DNA viral est une simple chaîne linéaire d'environ 5000 nucléotides. Le seul gène viral identifié à ce jour code pour la coque protéique de la particule. Des parvovirus ont été isolés chez les insectes, les oiseaux et de nombreux mammifères incluant l'homme. Ils se répliquent exclusivement dans les *cellules en prolifération* et sont responsables de la lyse de ces dernières. Il s'en suit que le fœtus et le nouveau-né sont plus sensibles aux parvovirus que l'adulte dont seuls les tissus en prolifération sont la cible de ces virus. *En tuant les cellules en division*, les parvovirus exercent une action pathogène, voire mortelle, dont l'impact peut être considérable du point de vue économique (élevages d'oies et de porcs) et sentimental (chiens et chats). Toutefois, la lyse des cellules en prolifération pourrait également être bénéfique si elle touchait préférentiellement les cellules cancéreuses. Chez les rongeurs, les parvovirus exercent effectivement une *action antitumorale*. Nous avons développé (S. Mousset et J. Rommelaere) un système de culture *in vitro* qui reproduit la sélectivité de l'attaque parvovirale vis à vis des cellules malignes. Nous utilisons ce système original pour analyser le mécanisme de l'action antitumorale de ces virus et pour tenter de l'exploiter.

Le Parvovirus permet également d'analyser les activités cellulaires impliquées dans l'apparition des mutations. Comme le génome des parvovirus est constitué d'un seul brin d'ADN, les lésions qui y sont induites ne peuvent être éliminées par excision avant la synthèse d'une forme répliquative bicaténaire. Il s'en suit que les parvovirus sont particulièrement sensibles à l'induction de lésions prémutagènes.

La mutagenèse virale est mesurée par la réversion de mutations qui abolissent l'infectivité virale dans des conditions de culture dites restrictives, par exemple à température légèrement plus élevée (39°C) que la valeur physiologique (37°C). Il est ainsi possible de déterminer le titre du virus revertant produit par les cellules infectées et d'en déduire les capacités cellulaires de répliquer et de mutagéniser un ADN intact ou de réparer et de mutagéniser un ADN endommagé par des doses même faibles d'agents génotoxiques. L'ensemble des manipulations est rapide et la lecture se fait au bout de 7 jours. Le système utilisé permet ainsi d'évaluer les rôles respectifs des lésions prémutagènes formées dans l'ADN viral et des fonctions mutatrices induites dans la cellule. L'exposition de cellules (humaines par exemple) à des doses non toxiques de rayonnement ultraviolet ou de certains cancérigènes chimiques y induit une activité de réplication infidèle de l'*ADN parvoviral intact*. Pour autant que la mutagenèse virale soit indicatrice de la mutagenèse cellulaire, ceci suggère que la majorité des mutations induites par de faibles doses de ces agents résulte de l'activation d'une fonction cellulaire qui diminue la fidélité de la réplication plutôt que de la formation de lésions prémutagènes dans l'ADN. Il s'en suit que le risque mutagène dans des cellules exposées à des doses non létales de certains agents génotoxiques peut être supérieur à celui attendu du nombre de lésions prémutagènes formées dans l'ADN et ne peut pas être prédit simplement par une extrapolation à l'origine du risque observé à fortes doses. Ces considérations sont importantes car les effets de faibles doses d'agents physiques ou chimiques sont encore mal connus, alors que ce sont précisément ces faibles doses auxquelles l'homme risque le plus d'être exposé et pour lesquelles le seuil d'exposition acceptable doit être déterminé. Le système décrit ci-dessus est donc bien adapté à l'étude chez l'homme, de la régulation du système cellulaire mutagène dont l'activité est accrue par divers agents génotoxiques (voir VII). L'utilisation d'une sonde virale permet une analyse beaucoup plus poussée que si seules les cellules avaient été soumises aux agents mutagènes ou cancérigènes dont on veut estimer les effets.

CHAPITRE IX

DE LA RECHERCHE FONDAMENTALE AUX APPLICATIONS

P. CAILLET-FAUQUET, G. MAENHAUT-MICHEL, M. RADMAN
et J. ROMMELAERE

«It is a good working rule for the biologist, that evolution is a lot cleverer than he is.»

F. Crick.

Toutes les données exposées ci-dessus peuvent paraître très académiques et bien loin de préoccupations pratiques. Ce serait ignorer nos motivations profondes qui ont toujours été de réduire le fossé entre fondamental et appliqué, car nous avons au contraire toujours été convaincus que l'homme de science ne peut vivre et marge de la société, ce qui l'amène naturellement à projeter les problèmes fondamentaux (de la biologie) vers leurs applications.

L'utilisation industrielle et la mise sur le marché d'un nombre sans cesse croissant de produits nouveaux (notamment les médicaments) rend nécessaire la mise au point de tests commodes permettant d'évaluer le risque mutagène et/ou cancérigène que ces substances présentent pour l'homme, qu'il s'agisse de risques professionnels ou de pollution pouvant affecter toute une population. Les tests sur animaux de laboratoire, utilisés traditionnellement, sont relativement peu sensibles, longs, difficiles à contrôler et extrêmement coûteux, en particulier lorsque l'effet de l'administration chronique de doses faibles ou l'effet combiné de plusieurs agents est recherché.

Nous avons vu tout au long de ces chapitres que de nombreux agents chimiques et physiques (radiations) sont susceptibles d'altérer l'ADN et d'interférer les uns avec les autres. Ils induisent beaucoup d'effets cellulaires identiques et provoquent, avec plus ou moins d'efficacité, des lésions mutagènes et/ou cancérigènes, risque souvent difficile à chiffrer.

Il est également utile de pouvoir estimer à posteriori le risque encouru par une personne exposée durant de longues années à des agents mutagènes/cancérigènes, car dans beaucoup de cas il s'agit de très faibles doses d'un grand nombre d'agents différents par ex. médicaments, rayonnement, fumée de cigarette). Les recherches ci-

dessus nous indiquent que ce type de diagnostic à posteriori est à portée de main.

1. *Nouveau test bactérien pour la détection d'agents mutagènes/cancérogènes*

(en collaboration avec C. DAMBLY-CHAUDIÈRE et Z. TOMAN)

Un microbiologiste américain, Bruce Ames, a montré il y a une dizaine d'années que diverses substances cancérogènes chez les mammifères et l'homme sont mutagènes chez la bactérie et il a proposé un test couramment utilisé actuellement en toxicologie.

A partir des données mentionnées au chapitre VII et dans le chapitre de R. Thomas, page 19, nous avons développé un test, rapide et simple, qui permet de détecter les agents *cancérogènes* (cancérogènes complets ainsi que les initiateurs ou les promoteurs), les *mutagènes* de différentes spécificités et les *clastogènes* (c'est-à-dire les agents induisant des aberrations chromosomiques (TOMAN *et al.* 1980). Ce test est fait à l'aide de bactéries *E. coli* qui permettent d'identifier aisément (fig. 1) les effets des agents mutagènes/cancérogènes, c'est-à-dire les effets génétiques (mutations M, recombinaisons R et les changements épigénétiques (I) (voir titre VII). Nous avons élaboré une méthode mathématique (L. Tennenbaum) permettant de quantifier les effets M, I, R. Grâce aux paramètres obtenus, nous avons pu comparer de manière quantitative les effets génotoxiques multiples provoqués par des agents aussi différents que des substances chimiques et des irradiations. Ce test rend possible des *corrélations* entre la capacité de chaque agent muta/cancérogène d'induire les effets génétiques (M et R) et épigénétiques (I) et leur pouvoir cancérogène (obtenu par l'expérimentation sur animaux ou l'épidémiologie humaine) (voir titre VII). L'établissement de telles corrélations pourrait avoir une grande importance théorique pour *comprendre les causes de la cancérisation* ; pratiquement, elles devraient permettre d'indiquer la puissance cancérogène éventuelle d'une substance dont les effets sont inconnus et être d'une grande utilité dans la prévention du cancer.

2. *Tests de détection des agents génotoxiques dans les cellules de mammifères*

(J. ROMMELAERE et J. CORNELIS)

Un test rapide et couramment employé est l'induction d'*aberrations* et de *réarrangements chromosomiques et chromatidiens*. Cette méthode

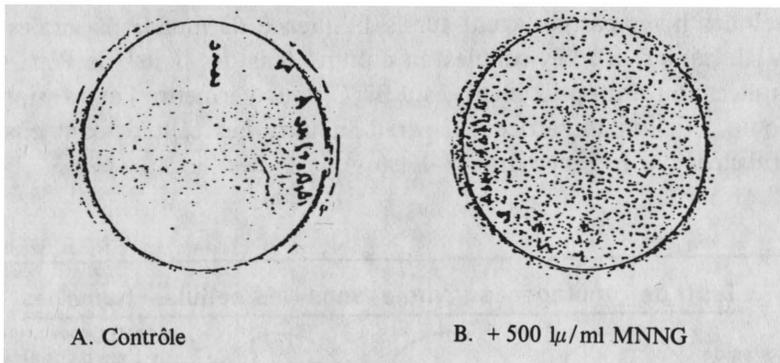


FIGURE 1.— Une aliquote d'une culture de la bactérie indicatrice est étalée sur un milieu coloré indicateur. Les changements épigénétiques et génétiques peuvent être détectés et différenciés grâce à la morphologie des colonies bactériennes obtenues sur un milieu indicateur approprié.

Exemple :

A. bactéries non traitées (Contrôle) : colonies blanches.

B. bactéries traitées à la N-méthyl-nitro-N nitroso-guanidine (MNNG) puissant mutateur.

les colonies foncées proviennent de bactéries mutées (effet génétique).

n'est toutefois pas universelle car l'induction de mutations ne s'accompagne pas nécessairement de changements caryotypiques.

Des systèmes de sélection ont également été développés, permettant d'évaluer l'induction de mutations ou de transformation maligne dans des gènes de cellules en culture. Ces systèmes sont toutefois laborieux, longs (environ 1 mois) et coûteux.

Il est donc apparu souhaitable de développer des tests sur cultures de cellules plus commodes et susceptibles d'être utilisés de manière routinière et confrontées à des expériences sur l'animal entier. Les cellules de mammifères, y compris les cellules humaines, peuvent être mises en culture au laboratoire et exposées à des doses non létales d'agents mutagènes/cancérogènes potentiels : on peut notamment choisir des lignées cellulaires possédant les systèmes enzymatiques d'activation des agents chimiques et contrôler mieux que sur l'animal entier l'équilibre hormonal du milieu qui peut être modifié par la drogue à tester.

Le risque mutagène de l'exposition à un agent physique ou chimique est évalué en déterminant l'effet du traitement d'un Parvovirus ou des

cellules hôtes par cet agent sur la fréquence de mutations virales (cf. VIII, paragr. B). Les cellules en culture dans des boîtes de Petri sont traitées (ou non) puis incubées à 37°C pour permettre l'expression de toute fonction mutatrice qui serait induite. Les cellules sont ensuite infectées par le Parvovirus H-1 ts6.

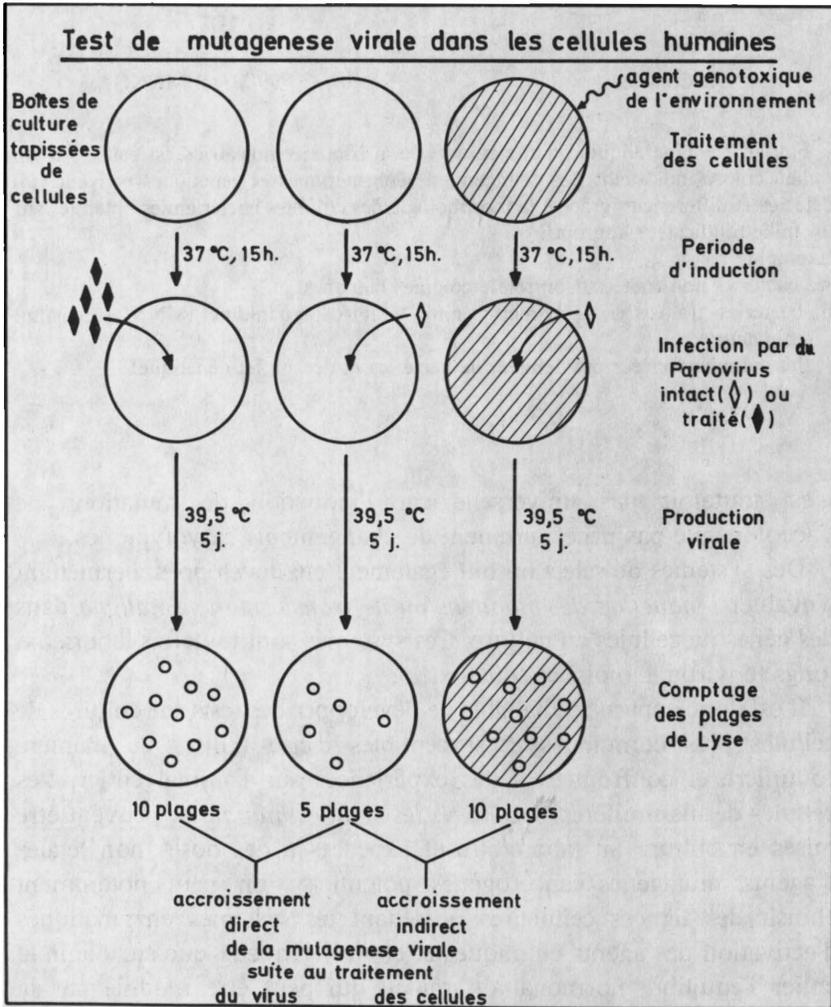


FIGURE 2.

Ce virus est affecté d'une mutation thermosensible supprimant son infectivité à 39.5°C. Seuls les virus révertants seront donc produits à cette température et induiront la formation de plages de lyse dans la monocouche de cellules. Le dénombrement des plages de lyse permet de mesurer la fréquence de mutations (réversions) et après traitement indépendant du virus et des cellules (fig. 2). L'utilisation d'une sonde virale présente donc un grand intérêt pratique et permet de mesurer séparément deux effets mutagènes possibles (directs et indirects) des agents chimiques et physiques de l'environnement et être utilisé pour la détection rapide de ceux qui sont potentiellement dangereux pour l'homme. De plus, il éclaire, comme pour le test bactérien, les mécanismes fondamentaux génétiques et/ou épigénétiques responsables de la mutagenèse et, vraisemblablement des premières étapes de la cancérisation.

3. *Des enzymes bactériennes pour connaître la charge de mutations accumulée chez l'homme*

(BOURGUIGNON-VAN HOREN, DOHET, MAENHAUT-MICHEL et RADMAN)

Comme nous l'avons exposé (voir VI), nous avons montré que le système de correction des bases mal appariées est dirigé par la méthylation des séquences GATC de l'ADN qui permet la discrimination entre la fibre parentale méthylée et la fibre néosynthétisée transitoirement sous méthylée.

En plus de l'aspect fondamental de ces mécanismes qui précisent les bases moléculaires de la stabilité et de la variabilité génétiques, la recherche, la purification et la caractérisation *des enzymes impliquées dans la correction des bases non complémentaires* devraient permettre la mise au point d'un test original et extrêmement sensible capable de déterminer le taux de mutations contenu dans des cellules somatiques (*) ou germinatives (*) de n'importe quel organisme vivant, y compris l'homme, notamment lorsqu'il a été anormalement exposé au cours de son existence à des agents mutagènes et/ou cancérogènes. Actuellement les enzymes de restriction bactériennes préparés à

(*) *mutations somatiques* : mutations se produisant dans des cellules qui ne sont pas destinées à devenir des cellules sexuelles ; bien des changements essentiels rendant une cellule cancéreuse pourraient être des mutations somatiques.

mutations germinatives : mutations se produisant dans des cellules destinées à devenir des cellules sexuelles et responsables de changements héréditaires.

l'échelle industrielle, sont largement utilisées pour étudier l'organisation du génome humain. De même, on peut envisager d'utiliser les enzymes de correction des bases mal appariées pour mesurer de façon quantitative n'importe quelle divergence de séquences dans des ADN provenant de différentes cellules d'un même organisme (mutation somatique) ou extraits de cellules appartenant à des organismes différents (mutation des cellules germinales, divergence évolutive). Grâce à ce même matériel enzymatique, on peut aussi envisager qu'il soit un jour possible de localiser physiquement la position de mutations sur l'ADN humain, notamment celles qui ont un impact médical important.

Ces recherches d'ordre appliqué sont effectuées dans le même laboratoire et par les mêmes chercheurs que les recherches fondamentales décrites dans les précédents chapitres. Malheureusement, on peut craindre que, dans un petit pays comme le nôtre, le bénéfice pratique finisse par être cueilli par d'autres, alors que le «gros» de l'investissement, notamment celui qui concerne l'aspect conceptuel, a été consenti ici.

CHAPITRE X

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

M. RADMAN

«Nous devons rendre les choses aussi simples que possible, mais pas plus simples.»

Einstein.

Le maintien de la stabilité de l'information génétique

Un être humain commence sa vie avec une double copie de ses gènes contenue dans un ovule fécondé diploïde ; il la termine avec environ 10^{15} cellules qui constituent son corps. Entretemps certaines populations cellulaires se sont renouvelées grâce aux cellules souches qui peuvent avoir engendré 10 à 100 fois plus de cellules avant d'avoir atteint l'état adulte (par exemple la peau, l'épithélium digestif, ...). Une minuscule partie des cellules issues de celles-ci sont porteuses de l'information génétique qui sera transmise à la génération suivante par

les cellules sexuelles. Le fonctionnement correct de l'organisme, son hérédité et la stabilité des espèces exigent une précision de la duplication de l'ADN remarquablement élevée au cours de ces 10^{16} à 10^{17} divisions, chacune d'elles impliquant un ADN d'environ $5 \cdot 10^9$ nucléotides.

En effet, le taux d'erreurs au cours de cette réplication est infime, de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-11} mutations ponctuelles par nucléotide répliqué. (une erreur par 500 cellules répliquées !). Pour atteindre cette précision dans la réplication de l'ADN, comme dans tout autre processus de reproduction hautement fidèle, il existe des «relectures» à divers niveaux comme 1) la surveillance de l'intégrité de l'information originale, 2) l'existence d'une machinerie de reproduction de cette information faisant un minimum d'erreurs et 3) la correction de chacune des copies ainsi reproduites, en utilisant chaque fois l'original comme référence, ce qui implique la nécessité de distinguer celui-ci de la copie (sinon le processus pourrait être plus nocif qu'avantageux).

Nous avons montré qu'en ce qui concerne l'information génétique bactérienne, il existe à la fois 1) une capacité de réparer des altérations de la structure de l'ADN provoquées par des agents extérieurs, 2) au moins deux systèmes de relecture pendant la synthèse de l'ADN, et 3) une relecture post répliquative de la chaîne d'ADN néosynthétisée, qui est corrigée en utilisant une seconde fois la chaîne parentale comme matrice de références. Dans les cellules supérieures, l'accroissement de la masse d'information (de l'ADN) est compensée par un nombre considérable d'unités qui se répliquent de manière indépendante, ce qui permet localement une réplication plus lente qui pourrait compenser certains mécanismes de correction qui semblent avoir été perdus au cours de l'évolution.

Mécanisme cellulaire actif qui diminue la précision de la réplication

Il n'est qu'apparemment paradoxal qu'à l'encontre de ces multiples systèmes de réparation et de haute fidélité de réplication qui assurent la stabilité de l'information génétique, il existe un programme cellulaire dont la fonction est de diminuer temporairement la précision de la réplication, induisant ainsi un effet mutateur. Ce programme n'est activé que dans des conditions de *détresse* cellulaire et il fait partie d'un système inductible complexe appelé induction SOS (RADMAN, 1974).

Du point de vue phénoménologique nous avons pu déterminer que l'effet mutateur SOS résulte d'une baisse de la fidélité de la machinerie

répliquative. On peut donc se demander quel avantage peut trouver une cellule ou un organisme à mettre en œuvre ce système mutateur SOS.

En termes darwiniens, nous pensons que dans des conditions de détresse, c'est-à-dire un danger d'extinction de la population cellulaire, ce système mutateur, capable d'augmenter rapidement la variabilité génétique, augmente l'aptitude (fitness) de la population en créant de rares mutants capables de faire face à des conditions nouvelles défavorables et de sauver l'espèce !

Si ce système SOS est amené à fonctionner dans notre organisme, il pourrait entraîner des conséquences nocives pour l'individu comme l'accumulation de mutations dans les cellules souches et probablement la cancérisation. Les recherches exposées ici sur des processus analogues à la réparation SOS des bactéries dans les cellules de mammifères en culture (ROMMELAERE et CORNELIS) suggèrent que ce système est plus facilement inductible et qu'il est plus efficace que chez les bactéries (peut-être est-il contrôlé par des hormones ou des facteurs de croissance). Il serait donc important de rechercher ce qui se passe au niveau des cellules souches, germinales ou somatiques. La grande sensibilité de ces cellules, notamment aux radiations ionisantes est-elle une indication qu'il n'y a pas induction SOS mutagène ? Dans ce cas, les lésions induites dans l'ADN constitueraient un signal de suicide, assurant la prolifération des seules cellules génétiquement intactes.

Remaniements chromosomiques

Une autre source de variabilité génétique sont les remaniements chromosomiques, c'est-à-dire des remaniements homologues ou non, de séquences préexistantes de l'ADN (échanges, translocations/transpositions, duplications, insertions et délétions), découvertes depuis longtemps lors de la méiose (formation des gamètes).

Dans les cellules de mammifères, le risque génétique causé par les remaniements chromosomiques peut être estimé à un facteur mille fois plus élevé que la mutagenèse résultant d'erreurs de synthèse de l'ADN et pourrait constituer une étape déterminante de la cancérogénèse (promotion) (KINSELLA et RADMAN, (1978) (1980).

Cette proposition s'est vue renforcée par le fait que plusieurs syndromes humains à haute incidence de cancer montrent un niveau élevé de remaniements chromosomiques spontanés, ainsi que dans la récente découverte que le caractère malin résulte dans certains cas d'oncogénèse virale, d'un remaniement chromosomique par l'intermédiaire d'un virus.

De la recherche fondamentale aux applications

Nous sommes encore loin de comprendre les mécanismes moléculaires qui déterminent la fréquence et la spécificité des altérations du génome telles que mutation, recombinaison et transformation maligne, ainsi que la réparation ou la correction de l'ADN, qui empêchent que de telles altérations apparaissent. Ce n'est évidemment que de connaissances tout à fait nouvelles dans ces domaines que peuvent naître des applications médicales ou technologiques originales et bénéfiques.

Nous espérons qu'en comprenant les mécanismes de la mutagenèse et des remaniements chromosomiques au cours de la cancérogenèse, il sera possible d'intervenir de manière rationnelle pour inhiber l'induction de ces événements et proposer une prévention efficace. Il n'est plus irréaliste d'espérer pouvoir un jour diriger spécifiquement des agents biologiques, éventuellement des virus ou des agents chimiques, vers des cellules cancéreuses, même dans le cas de cancers déclarés. Les découvertes récentes – démontrant que l'oncogénèse virale est souvent due à une transposition, à l'aide du génome viral, d'oncogènes contenus dans les cellules normales – nous encouragent à tenter d'identifier ces oncogènes à partir des «bibliothèques» d'ADN humain, cloné dans des virus bactériens. L'étude du contrôle de l'activité de ces oncogènes est un défi scientifique tant au niveau fondamental qu'au niveau de la médecine. La technologie existe, seuls les moyens manquent ! ... dans notre Pays.

RÉFÉRENCES (*)

- CAIRNS, John. – Cancer Science and Society. Freeman and Co., San Francisco, 1978.
- CRICK, F.– Life itself : its origin and nature. McDonald and Co (London & Sidney) 1982.
- DAWKINS, R.– The selfish gene. Oxford University Press, 1981 (1^e édition 1976).
- EIGEN, M., GARDNER, W., SCHUSTER, P., WINKLER, R., WATISCH, O.S.– The origin of genetic information. Scientific American, avril 1981, p. 78.

(*) Les références aux travaux scientifiques cités dans le texte peuvent être trouvées dans le rapport Biologie Moléculaire 1976-81 du groupe de Rhode.

- HOWARD-FLANDERS, P.— Pourquoi y a-t-il si peu de mutants ? Pour la Science, n° 51, p. 102, janvier 1982.
- JACOB, F.— La logique du vivant : une histoire de l'hérédité. Gallimard, 1970.
- JACOB, F.— Le jeu des possibles : essai sur la diversité du vivant. Fayard, 1981.
- JUDSON, A.F.— The eighth day of creation. London Cape 1979.
- PTASHNE, M., JOHNSON, A. D., PABO, C.O., Scientific American, novembre 1982, p. 106.
- RADMAN, M., ROMMELAERE, J., ERRERA, M.— Stability and Evolution of DNA from the point of view of Molecular Radiobiology, dans : Physico-chemical properties of nucleic acids. Ed. par J. Duchesne, vol. 3 (1973) pp. 161-201. Academic press.
- RADMAN, M., JEGGO, P., WAGNER, R.— Chromosomal rearrangements and carcinogenesis. Mutation Research 98, 249-264 (1982).
- SARASIN, A.— Le cancer et la réparation de l'ADN. La Recherche, n° 124, 12, 824-838, 1981.
- WITKIN, E.— From Gainesville to Toulouse : the evolution of a model. Biochimie 64, 549-555 (1982).
-

René Thomas

Titre IV

Recherches sur le contrôle génétique de l'expression, de la réplication et de la recombinaison

Le chat a quatre pattes.
Isidore et Fricot ont chacun quatre pattes.
Donc Isidore et Fricot sont des chats.
– Mon chien aussi a quatre pattes
– Alors, c'est un chat
Ionesco
(Rhinocéros)

Comment deux cellules dérivant d'une même cellule-œuf et contenant la même information génétique peuvent-elles donner naissance, l'une à des cellules musculaires, l'autre à des cellules de muqueuse intestinale ? Si l'on veut avoir le moindre espoir de comprendre un jour cette différenciation, il faut d'abord comprendre les mécanismes élémentaires de contrôle de l'expression génétique.

Un mode de contrôle important procède par interactions entre les gènes et leurs produits diffusibles ; un autre mode, connu surtout par les progrès récents en immunologie (voir le Titre VIII) et dans le domaine des trypanosomes (voir le Titre VI), procède par remaniements locaux du DNA. Le présent chapitre évoque une série de recherches dont le lien n'est sans doute pas évident à première vue, mais qui ont en commun d'apporter de l'information sur l'un ou l'autre de ces deux types de mécanismes de contrôle. D'autres aspects de notre recherche seront traités dans les Titres XIII (A. GHYSEN), XIV (C. DAMBLY et A. GHYSEN) et XV (R. THOMAS).

CHAPITRE I

UN EMBRYON DE DIFFÉRENCIATION : LE MODE DE VIE DES BACTÉRIOPHAGES TEMPÉRÉS

Section 1.— *Virus et bactéries ; bactériophages*

Virus et bactéries représentent des niveaux d'organisation radicalement différents. Les bactéries sont les plus simples des cellules, mais en tant que telles elles ont tous les attributs de la vie : matériel génétique (constitué de DNA), machinerie de synthèse protéique, système de stockage et d'utilisation d'énergie, membranes, motilité, une certaine sensibilité ...

Au contraire, les virus sont parfaitement inertes tant qu'ils n'ont pas rencontré une cellule-hôte appropriée. La particule virale (*virion*) se réduit à un matériel génétique, qui peut être du DNA ou du RNA, enveloppé dans une «capside» protéique, parfois très élaborée certes, mais dépourvue de toute machinerie de synthèse protéique et de tout système producteur d'énergie. L'information présente dans le matériel génétique des virus ne peut s'exprimer qu'en parasitant les systèmes enzymatiques de la cellule-hôte : même les enzymes *codés* par le virus sont *synthétisés* par l'hôte.

Beaucoup de nos connaissances en biologie moléculaire nous viennent des virus, et plus spécialement des *bactériophages*, c'est-à-dire des virus qui s'attaquent aux bactéries. On peut dire d'une manière un peu sommaire que cela s'explique par la relative simplicité des virus, et par le fait que la culture de certaines bactéries et de leurs virus ne présente guère de difficultés techniques.

Section 2.— *Bactériophages tempérés*

La plupart des virus sont de francs parasites, qui utilisent pour se reproduire les mécanismes de la cellule infectée ; à l'issue de ce cycle, la cellule libère de nouveaux virions semblables à celui qui l'avait infectée, et bien souvent elle en meurt par éclatement (*lyse*). Mais il existe aussi des virus *tempérés*, qui peuvent établir avec la cellule infectée une association permanente extrêmement curieuse : le matériel génétique du virus s'intègre dans celui de la cellule-hôte et devient une partie de son patrimoine héréditaire ; est-il besoin de dire que dans ces

conditions un mécanisme empêche l'expression de celles des fonctions du virus qui seraient létales pour la cellule ? Cette association a été étudiée de la manière la plus approfondie chez les bactéries ; les bactéries qui ont intégré dans leur génome celui d'un bactériophage sont dites *lysogènes* parce qu'elles contiennent et transmettent à leur descendance une information virale latente susceptible d'entraîner la lyse de la bactérie. Les aspects essentiels de la lysogénie ont été mis en évidence par LWOFF (1953), JACOB et WOLLMAN (1957) et CAMPBELL (1961), particulièrement dans le cas du bactériophage «lambda» et de ses cousins les «lambdoïdes».

Pour comprendre la structure du DNA tel qu'on le trouve dans les particules de ces virus, on peut (en simplifiant) raisonner comme si le résultat final de la réplication était une population de molécules *circulaires* (*), formées chacune d'une double hélice de Watson-Crick refermée sur elle-même de manière covalente. Lors de la formation des particules d'un bactériophage lambdoïde, une enzyme comparable *aux enzymes de restriction* (voir Chapitre V) reconnaît une séquence unique de la molécule de DNA et coupe les 2 fibres à des niveaux légèrement différents ; la molécule circulaire engendre ainsi une molécule *linéaire* (**) dont l'essentiel (environ 50.000 paires de bases) est en double hélice, mais dont les deux fibres se prolongent l'une à une extrémité de la molécule, l'autre à l'autre, par une séquence «célibataire» de 12 nucléotides. La fonction virale «Ter» responsable de ce processus a été identifiée ici au laboratoire (MOUSSET et THOMAS, 1968). Les deux séquences dont il vient d'être question sont évidemment complémentaires, puisqu'elles étaient appariées dans la molécule circulaire. Aussi, peuvent-elles se retrouver et se recoller (d'où le nom imagé de «bouts collants»), reformant ainsi une molécule circulaire ; la soudure est rendue covalente par une enzyme *ad hoc*, la ligase. Le DNA du virus, linéaire dans le virion, se circularise de la sorte après avoir été injecté dans la cellule.

Dès lors, ce DNA peut se comporter de l'une ou de l'autre des deux manières évoquées plus haut : il se multiplie sans frein dans la réponse «lytique», qui aboutit à la mort de la bactérie avec libération de

(*) *Circulaire* est pris ici dans un sens topologique : la molécule n'a évidemment pas la *forme* d'un cercle mais elle est, comme un cercle, refermée sur elle-même.

(**) Comme «circulaire» (voir plus haut), «linéaire» est pris ici dans un sens topologique.

nombreuses particules virales ; dans la réponse «lysogène», il s'intègre dans la continuité du chromosome bactérien. Cette intégration résulte d'un échange génétique entre un site bien déterminé du chromosome bactérien et un site également bien déterminé du chromosome viral. Comme cette recombinaison se produit entre deux molécules de DNA circulaires, le résultat est une structure circulaire unique ; la Figure 1 montre que l'ordre des gènes du prophage est une permutation bien définie (... N ... RA ... J ...) de l'ordre de gènes dans le DNA des particules virales (A ... J ... N ... R).

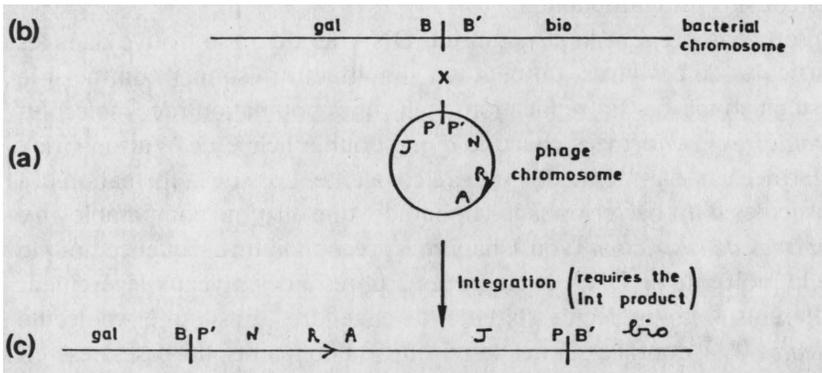


FIG. 1. – Intégration du DNA d'un bactériophage lambdaïde dans le chromosome bactérien (Campbell 1961). Le chromosome du bactériophage (a) «étiqueté» par les gènes A, J, N et R et par le site d'intégration PP', se circularise, et se recombine (b) avec le chromosome bactérien, où sont représentés les gènes *gal* (fermentation du galactose), les gènes *bio* (synthèse de la biotine) et le site d'intégration BB'. En (c), on voit le résultat de l'intégration.

Section 3.– Pourquoi étudier les bactériophages tempérés ?

L'intérêt de ce genre de situation est profond et multiple.

Tout d'abord, nous voyons qu'un matériel génétique exogène peut envahir le génome d'une cellule et en devenir partie intégrante, transmissible héréditairement. Remarquons que dès le début de ses travaux dans le domaine, le grand biologiste François Jacob avait pressenti le rapport entre lysogénie et cancer. Depuis, il est devenu clair que beaucoup de cancers sont effectivement d'origine virale, et que, comme les bactériophages tempérés, les virus *oncogènes* (*) s'intègrent

(*) Virus responsable de cancers.

dans un chromosome de la cellule hôte ; cette intégration est un élément essentiel de leur caractère tumorigène.

Ensuite, un même segment de DNA, le génome viral, peut se comporter d'au moins deux manières différentes. *Ou* il multiplie sans frein son acide nucléique et fait produire en abondance par la bactérie les protéines virales ; ces protéines s'assemblent autour de l'acide nucléique pour former les virions, et ceux-ci sont libérés par éclatement de la bactérie. *Ou* des mécanismes qui seront décrits plus loin, empêchent l'expression des fonctions proprement virales et, si le DNA viral a pu s'intégrer dans le génome bactérien, il est désormais transmis à titre héréditaire.

Il s'agit l' à d'une caractéristique essentielle des virus tempérés, la possibilité d'un «choix» entre deux destinées : celle d'un virus lytique et celle d'un commensal intégré au patrimoine génétique de la cellule-hôte. Nous nous trouvons déjà en présence d'une forme élémentaire de différenciation, dans la mesure où un même génome peut se comporter durablement de deux manières radicalement différentes dans des conditions apparemment semblables. Mais alors qu'en aucun cas un phénomène de différenciation embryonnaire d'organisme supérieur n'est compris dans le détail, on en sait long sur les mécanismes de contrôle chez les bactéries et leurs virus, et, en particulier, ceux qui président aux choix entre la lyse et la lysogénéisation par le phage lambda. Une étape cruciale dans ce domaine a été franchie par Jacob et Monod qui ont démontré l'existence de mécanismes de régulation négative et, plus généralement, dégagé la notion de *gène de régulation* et de site *opérateur* (voir ci-dessous).

Section 4.— *Contrôles négatifs et positifs*

Comme l'ont montré Jacob et Monod, des gènes remplissant des fonctions apparentées sont souvent groupés en un segment de DNA qui est transcrit en un RNA messenger unique ; on dit alors que ces gènes forment un *opéron*. Le fonctionnement d'un opéron est réglé par un *gène de régulation*, c'est-à-dire, un gène dont le produit a pour seul rôle d'exercer un contrôle sur l'expression d'autres gènes. Dans les deux cas étudiés par Jacob et Monod, il s'agit de régulation négative : le produit du gène de régulation est un *répresseur*, protéine capable de reconnaître spécifiquement une séquence de DNA dite *opérateur*, qui se trouve à l'origine de l'opéron. Disons en simplifiant qu'un opéron

soumis à un contrôle négatif est transcrit en mRNA, à moins que soit présent le répresseur, qui se fixe à l'origine de l'opéron et empêche sa transcription. En particulier, l'un des gènes du bactériophage λ , intitulé cI, a pour produit un répresseur capable de bloquer l'expression de tous les autres gènes de ce virus. C'est ce répresseur, auquel nous avons déjà fait allusion dans la Section 3, qui permet la survie des bactéries lysogènes en empêchant l'expression des gènes létaux pour la bactérie. Notons que la présence de ce répresseur paralyse non seulement le bactériophage intégré (prophage) mais aussi tout virus de même type qui viendrait à infecter la bactérie lysogène : le répresseur synthétisé par le prophage confère à la bactérie lysogène l'immunité vis-à-vis des phages de même type.

Nous avons pu montrer peu après que ce contrôle négatif exercé par le répresseur de λ sur l'ensemble des autres fonctions du prophage ne s'appliquait que de manière indirecte à la plupart des gènes. En effet, il est possible de court-circuiter ce contrôle, en d'autres termes, de lever le blocage de l'expression de ces gènes alors même que l'immunité persiste. Le point de départ de cette recherche a été l'observation que certains mutants *défectifs* de λ , qui ne poussent pas sur une bactérie ordinaire, poussent normalement si cette bactérie a été rendue lysogène pour un bactériophage apparenté à λ , mais de spécificité d'immunité différente (si le prophage utilisé était un λ , son immunité empêcherait la croissance d'un autre λ , même non déficient). Une analyse extrêmement serrée a permis de montrer sans ambiguïté que le phage déficient «surinfectant» la bactérie lysogène enclenche l'expression de nombreux gènes du prophage, sans cependant que l'immunité soit affectée : le blocage que l'immunité exerçait sur ces gènes est donc indirect (THOMAS, 1966, 1970 ; DAMBLY, COUTURIER et THOMAS, 1968).

La manière dont s'exerce ce contrôle indirect de l'immunité a pu être élucidée ensuite. Pour exprimer en termes simples une situation complexe, disons que le développement normal du phage comporte l'expression d'un gène N, dont le produit est nécessaire à l'expression d'autres gènes, et, en particulier, du gène Q, dont le produit est, à son tour, nécessaire à l'expression des gènes dits «tardifs». Dans ces conditions, il suffirait que l'immunité bloque l'expression du gène N pour bloquer du même coup, mais indirectement, celle du gène Q, et par là même celle des gènes tardifs. En fait – double sécurité – l'immunité exerce un contrôle direct sur l'expression des gènes N et Q ; le blocage de Q est donc à la fois direct et indirect (via N) alors que le

blochage des fonctions tardives est uniquement indirect : L'enclenchement («transactivation») des gènes tardifs d'un prophage par surinfection hétéroimmune (voir paragraphe précédent) s'explique dès lors comme suit. Dans la bactérie lysogène non surinfectée, l'immunité bloque l'expression d'une série de gènes dont N et Q, et l'absence des produits de ces gènes empêche, directement ou indirectement, l'expression des autres gènes. Si on infecte cette bactérie par un phage d'immunité différente (donc insensible au répresseur) mais défectif pour une fonction tardive, ce phage réalise par lui-même l'expression de tous ses gènes, à l'exception du gène défectif. En outre, le produit du gène Q synthétisé par le phage surinfectant enclenche l'expression de l'ensemble des gènes tardifs du prophage, y compris celui qui est défectif dans le phage surinfectant. En d'autres termes le phage surinfectant aide le prophage à exprimer ses fonctions tardives, et cette expression, à son tour, fournit au phage surinfectant ce qui lui manquait pour achever son cycle.

Le point important dans la recherche qui vient d'être décrite est la mise en évidence de mécanismes de *régulation positive*. On pensait jusque là, et jusqu'aux travaux d'Engelsberg sur l'opéron arabinose, que la régulation de l'expression génétique comportait exclusivement des contrôles négatifs. Depuis, bien d'autres contrôles positifs ont été mis en évidence chez les organismes les plus variés.

Nous verrons au Titre XV comment contrôles positifs et négatifs se combinent en réseaux complexes.

CHAPITRE II

RECOMBINAISON ILLÉGITIME : LE BACTÉRIOPHAGE MU (MUTATEUR) (*)

La recombinaison génétique (traitée sous d'autres aspects au Titre III) joue un rôle essentiel dans la diversification des organismes : c'est grâce à elle que deux individus peuvent donner naissance à une telle variété de descendants, même s'ils ne diffèrent entre eux que par un nombre limité de caractères. Elle consiste en un réassortiment nouveau de séquences de DNA étroitement apparentées au sein de régions correspondantes («homologues») du matériel génétique de deux

(*) (Travail du groupe «Rhodomu» : Ariane Toussaint, Michel Faelen, Annette Résibois, Nicole Lefévre, Frédérique Van Gijsegem, Marc Collet...).

individus de même espèce. Il existe cependant des recombinaisons dites *illégitimes*. Elles se produisent entre segments de DNA non apparenté qui n'ont en commun que de courtes séquences de nucléotides ; c'est, par exemple, le cas des translocations, échanges génétiques entre chromosomes non homologues. Ces translocations et d'autres remaniements illégitimes sont responsables d'une grande partie des anomalies génétiques humaines. Cependant, leur intérêt est loin d'être purement négatif : des remaniements génétiques conditionnent la diversité des anticorps (voir le Titre VIII) et, probablement d'autres aspects du développement normal. Les recombinaisons illégitimes sont rares, ce qui rend leur étude très malaisée. Heureusement, un bactériophage (nommé Mu, pour *mutateur*) est capable d'induire tous les remaniements génétiques imaginables avec une fréquence suffisamment élevée pour que les mécanismes puissent être soumis à une analyse rigoureuse.

Au sein d'une série de lignées lysogènes pour le bactériophage Mu, le site d'intégration du virus est différent dans chaque cas : au lieu de s'intégrer comme le phage λ (section I de ce chapitre) en un point bien déterminé du génome bactérien, *Mu peut s'intégrer en de très nombreux sites du DNA de son hôte*. Chaque fois que cette intégration a lieu au sein d'un gène bactérien, ce dernier est scindé en deux parties, séparées par la longueur du DNA de Mu, 39.000 paires de bases ; il va sans dire que ce gène est inactivé, et c'est ce qui explique le caractère mutagène du bactériophage Mu.

Particularité originale de Mu : son DNA est à tout moment intégré entre deux séquences de DNA bactérien, que ce soit à l'état de prophage, lors de la réplication lytique ou même dans les particules virales. Incapable de former des cercles de DNA clos, il s'intègre immédiatement dans le chromosome de la bactérie qu'il infecte, ou dans un plasmide. Au cours de sa multiplication, on retrouve un nombre croissant d'exemplaires du génome viral, intégré chacun dans un site différent du DNA bactérien. Quand les particules virales se forment, elle emballent le DNA du phage en entraînant à ses deux extrémités les séquences bactériennes adjacentes. Ces séquences sont différentes dans chaque particule virale. On peut s'en rendre compte en dénaturant la population de molécules de DNA puis en la renaturant. Les fibres complémentaires se séparent lors de la dénaturation et se réassocient au hasard lors de la renaturation. L'examen au microscope électronique montre que les molécules de DNA ainsi reformées sont

fourchues à leurs deux extrémités («split ends») : les deux fibres sont complémentaires sur l'essentiel de leur longueur, mais non à leurs extrémités. Ce résultat s'explique aisément si les différents exemplaires du génome viral sont enchassés entre des séquences de DNA différentes : les deux fibres qui reforment une molécule de DNA lors de la renaturation, provenant en général de particules virales distinctes, auront des extrémités non complémentaires.

Le phage Mu peut réaliser dans les cellules qu'il infecte tous les remaniements génétiques imaginables. On retrouve dans les bactéries survivantes le segment de DNA bactérien remanié, encadré des deux prophages Mu : par un mécanisme qui n'est pas encore entièrement élucidé, le réarrangement génétique s'accompagne d'un dédoublement du phage. En fait, les mécanismes qui réalisent les remaniements chromosomiques observés chez les bactéries survivantes et ceux qui sont responsables de la simple multiplication du phage seraient fortement apparentés.

Partant du fait, déjà observé par Taylor, que le phage Mu pouvait s'insérer en de nombreux points du génome bactérien, nos chercheurs se sont d'abord posé la question suivante :

Mu peut-il insérer en de nombreux sites non seulement son propre génome, mais aussi d'autres segments de DNA ?

La réponse est : oui. Pour y arriver, Toussaint, Faelen et Couturier ont infecté, en présence ou en absence de Mu, une bactérie par un variant de λ incapable de s'intégrer par lui-même et de se répliquer. En l'absence de Mu, notre λ défectif est, comme prévu, dilué au cours des générations bactériennes et finalement perdu. Par contre, si la culture bactérienne est infectée simultanément par le phage λ défectif et le phage Mu, une fraction significative des bactéries survivantes sont lysogènes pour le λ défectif. L'astuce utilisée pour mettre en évidence l'intégration du λ est la suivante. La bactérie infectée est gal⁻, c'est-à-dire incapable de fermenter le galactose ; le λ défectif est porteur des gènes de l'opéron galactose, et peut donc corriger le défaut de la bactérie s'il est intégré dans son génome. L'utilisation d'un milieu contenant ce sucre et un indicateur coloré qui rend rouges les colonies bactériennes devenues Gal⁺ permet de les identifier, même si elles sont en nombre très petit.

L'analyse des bactéries lysogénisées par le λ défectif grâce à la présence de Mu s'est révélée particulièrement instructive : en présence du phage Mu, non seulement le λ défectif s'intègre, mais, comme le Mu

il s'intègre en les points les plus variés du génome bactérien (sur le chromosome principal ou sur un plasmide). Il a été constaté en outre que le λ se trouvait systématiquement encadré par deux phages Mu de même orientation et qu'au lieu d'être présent toujours dans le même ordre, les marqueurs de son génome se trouvaient en n'importe quelle permutation circulaire : contrairement à ce qu'il fait normalement, le λ est donc intégré par n'importe quel point de son génome. *Ces résultats revêtent un réel intérêt général : ils montrent qu'un organisme comme le phage Mu peut provoquer la recombinaison entre des segments de DNA dépourvus de toute homologie.* Un premier modèle vaut d'être mentionné quoiqu'à l'usage il ne se soit pas révélé correct dans le détail. (Il faut se rendre compte que la prétention normale d'un modèle n'est pas d'être le bon, mais d'expliquer les faits déjà connus, de prévoir des faits nouveaux ... et de servir de marchepied à un modèle meilleur lorsque des faits nouveaux le contredisent ; à cet égard, le modèle en question a été exemplaire). L'idée de base était que les deux extrémités de Mu, sans pouvoir se refermer de manière covalente, se reconnaissent néanmoins et forment un site d'intégration ; dans cette perspective, les extrémités de deux Mu pourraient se reconnaître mutuellement et former un dimère circulaire portant deux sites d'intégration. Que l'un de ces deux sites s'intègre n'importe où dans le chromosome bactérien, l'autre n'importe où dans le DNA circularisé du λ défectif, il en résultera un cercle unique où le λ sera intégré en n'importe quelle permutation, n'importe où sur le chromosome bactérien, entre deux Mu orientés de même (le lecteur aura la bonté de griffonner lui-même le schéma).

Ce modèle provisoire a eu la grande vertu de faire prévoir que Mu serait capable de susciter non seulement l'intégration d'un cercle de DNA, mais une série d'autres remaniements chromosomiaux : délétions, duplications, inversions, transpositions ... Chacune de ces prévisions a été vérifiée par le groupe et chaque fois avec une grande élégance. Je ne résiste pas à l'envie de mentionner l'astuce utilisée par M. Faalen pour mettre en évidence les inversions induites par Mu. A cet effet, il a utilisé des lignées bactériennes dites «Hfr», qui se comportent comme «mâles», c'est-à-dire, donneuses de matériel génétique : elles peuvent se conjuguer avec une bactérie «femelle» (réceptrice) et lui injecter leur chromosome à partir d'une origine déterminée et dans un sens déterminé. Si Mu peut provoquer des inversions, il doit, en particulier, être capable de produire à partir d'un

Hfr donné un Hfr injectant son chromosome à partir de la même origine, mais en sens inverse ; c'est bien le cas.

Parmi les remaniements chromosomiques induits par Mu, le plus intéressant en pratique est la *transposition* d'un segment de DNA de son site d'origine à un autre endroit du génome bactérien, sur le chromosome principal ou sur un plasmide. Mise en évidence par Faelen et Toussaint, elle est devenue un outil inestimable de génie génétique *in vivo*. On peut dire sans trop exagérer qu'il est maintenant possible de transférer quasi n'importe quelle région du chromosome bactérien de son site normal en tout autre point de ce chromosome ou d'un plasmide. L'un des développements les plus utiles de cette technologie est sans doute la possibilité de transferts génétiques entre espèces bactériennes éloignées.

En dehors des possibilités d'application qui viennent d'être évoquées, une question fondamentale se posait : quels sont les éléments génétiques de Mu nécessaires et suffisants pour réaliser la transposition ? Un ensemble de résultats suggérait la réponse : les extrémités du DNA de Mu et les produits de deux gènes baptisés A et B, localisés à proximité de l'une des extrémités. Si cette supposition était exacte, il devait être possible d'obtenir par délétion interne des «mini-Mu», prophages réduits aux extrémités du prophage normal mais restés néanmoins capables de provoquer cette transposition. Une série de tels mini-Mus ont effectivement été obtenus (TOUSSAINT, FAELEN et RÉSIPOIS). Tous possèdent les deux extrémités du prophage. Pour ceux qui possèdent les gènes A et B intacts, la fréquence de transposition reste normale ; si la délétion entame le gène B, la fréquence tombe d'un facteur 100 et si elle pénètre jusque dans le gène A le pouvoir de transposition disparaît. La présence d'un autre prophage portant un exemplaire intact de ces gènes supplée très bien à la perte de la fonction B, mais très mal à celle de la fonction A.

Serait-il possible d'obtenir le mini-Mu non seulement sous forme de prophage, mais aussi sous forme de virions ? On pouvait espérer atteindre ce but en induisant la production de phage dans une bactérie lysogène à la fois pour un mini-Mu et pour un Mu complet : ce dernier doit fournir au mini-Mu ce qui lui manque pour former les particules mûres. S'il en est bien ainsi, le lysat doit contenir des particules ayant un génome de type mini-Mu au lieu d'un génome normal ; comme le DNA des particules virales a une longueur déterminée, dont une fraction représente le génome de Mu et le reste du DNA bactérien, on

peut s'attendre à ce que le DNA des particules de mini-Mu comporte une longueur considérable de DNA bactérien, différent, comme il se doit, d'une particule à l'autre. C'est bien le cas, car après dénaturation et renaturation, on trouve des molécules terminées par des «split ends» dont la taille est tout à fait inhabituelle (mais prévisible, par différence, d'après la taille du mini-Mu).

Transduction générale par mini-Mu

La transduction générale est un transfert de gènes bactériens d'une lignée à l'autre par l'intermédiaire de particules virales ; elle résulte de l'inclusion accidentelle dans une particule virale, en lieu et place du DNA viral, d'un segment de DNA bactérien de même taille. Ce phénomène est rare ; mais on peut se dire que si les lysats décrits au paragraphe précédent contiennent environ 10% de particules de type mini-Mu, ce lysat doit transduire à haute fréquence les gènes de la bactérie. Cette supposition s'est concrétisée par la découverte de la transduction par mini-Mu.

Minimuduction

Lorsque le DNA bactérien contenu dans une particule transductrice a été injecté dans une bactérie, le processus de transduction se complète par un échange génétique entre le DNA transduit et la région homologue du chromosome récepteur. Cet échange est une recombinaison classique entre régions homologues. Il requiert l'intégrité des mécanismes de recombinaison de la bactérie ; aussi l'un des contrôles des expériences décrites dans la section précédente consiste-t-il à vérifier que la transduction par mini-Mu ne se manifeste pas dans une bactérie réceptrice déficiente pour la recombinaison («recA»). On pourrait cependant se dire : à quoi bon inclure dans l'expérimentation ce contrôle supplémentaire puisque le résultat en est couru d'avance ? Couru d'avance ? Voire. On trouve comme prévu que la présence d'une mutation recA dans la bactérie réceptrice réduit fortement la fréquence de transduction ; mais le transfert génétique résiduel est loin d'être négligeable (de l'ordre de 10%). En fait, une analyse plus poussée montre que la transduction proprement dite est bien supprimée par la mutation et que le transfert génétique résiduel est lié à un phénomène nouveau. Ce phénomène, baptisé «minimuduction» a été rapidement compris de la manière suivante : comme Mu, le mini-Mu en répllication se retrouve en de nombreux sites du chromosome bactérien. Il se peut

que deux exemplaires orientés de la même façon se trouvent suffisamment près l'un de l'autre pour être englobés dans un même virion. Dans ce cas, le DNA de ce virion comporte un segment de DNA bactérien entre deux mini-Mus. Une telle structure, injectée dans une bactérie, peut s'insérer en bloc en tout point de son génome sans faire intervenir les mécanismes de recombinaison classiques : c'est ce qui explique qu'une partie des particules transfèrent des gènes bactériens même dans une bactérie incapable de faire de la recombinaison légitime. Un virus proche de Mu mais de spécificité d'immunité différente, D108, se comporte de même ; dans ce cas, on parle de «Mini-déduction» !

Ces travaux sur le bactériophage Mu ont (au moins) un double intérêt. D'une part, ils ont fourni un *outil* inestimable de manipulation génétique *in vivo*, qui permet notamment de croiser des espèces éloignées ; d'autre part, ils contribuent à la compréhension des remaniements génétiques qui ont lieu à certains niveaux de la différenciation d'organismes plus complexes.

CHAPITRE III

RECOMBINAISON *in vitro* (alias : «MANIPULATIONS GÉNÉTIQUES»)

Section 1.— *Chimères entre le bactériophage λ et le facteur sexuel des bactéries (*)*

Le matériel génétique des bactéries comporte un «chromosome» principal, molécule de DNA circulaire (de longueur phénoménale : près de 2 mm, dans une bactérie de 1μ de long !) et, le plus souvent, des molécules de DNA additionnelles de plus petite taille, également circulaires, appelées *plasmides*. Le plus anciennement connu de ces plasmides est le facteur sexuel F, dont la présence dans une lignée bactérienne confère à cette lignée le caractère «mâle», c'est-à-dire, donneur de DNA. Le plasmide peut être indépendant du chromosome, et dans ce cas c'est lui seul qui peut être transmis d'une cellule donneuse à une cellule réceptrice : le caractère mâle est contagieux et se comporte, en fait, comme une maladie vénérienne ! Si, par contre, le

(*) (Travail du groupe de M. COUTURIER).

facteur sexuel est intégré dans le chromosome, il lui sert de véhicule, en sorte que les gènes du chromosome même peuvent être injectés dans la cellule réceptrice.

Si, dans le milieu protégé d'un laboratoire, des bactéries peuvent vivre sans plasmides, il est cependant de plus en plus clair que ces éléments génétiques jouent un rôle essentiel dans la compétitivité et l'évolution des bactéries en milieu naturel. L'importance des plasmides dans le domaine de la santé résulte de *l'origine plasmidique de la plupart des résistances aux antibiotiques ainsi que d'un grand nombre de déterminants de pathogénicité*. Il est important de remarquer que l'utilisation des antibiotiques dans la prévention et le traitement des maladies infectieuses (chez l'homme, le bétail ou les plantes) introduit une pression sélective qui favorise l'acquisition par un seul et même plasmide de déterminants de pathogénicité et de résistances aux antibiotiques. Dans un tel cas, la présence d'antibiotique dans un environnement sera un facteur de sélection des bactéries pathogènes, d'autant plus que ces plasmides sont non seulement transmis héréditairement, mais que certains d'entre eux peuvent, en outre, envahir par contagion des bactéries de lignées et même d'espèces différentes. On comprend dès lors que les plasmides jouent un rôle épidémiologique de premier plan, dans l'ensemble catastrophique pour nous.

«Il faut connaître la langue de ses ennemis» a dit Frédéric II. Cas particulier : si l'on veut lutter contre les résistances multiples et les facteurs de pathogénicité, il faut pouvoir étudier de manière appropriée les plasmides et les conditions de leur maintien dans les lignées bactériennes. L'étude génétique et biochimique directe des conditions de maintien des plasmides est hérissée de difficultés techniques. Par contre, ce même type d'étude a pu être réalisé avec succès pour le bactériophage λ et toutes les méthodes sont actuellement bien au point. L'approche de Martine Couturier a donc été la suivante : ne serait-il pas possible de séquestrer dans un bactériophage λ les gènes plasmidiques responsables de la réplication et du contrôle de la réplication afin de pouvoir les manipuler comme de «vulgaires gènes viraux» ?

Grâce aux techniques de recombinaison *in vitro*, cet objectif a pu être réalisé. Le segment médian, non essentiel, du DNA du bactériophage λ a été substitué par le DNA du mini-plasmide «F5», facteur sexuel réduit à la petite région nécessaire pour conserver une capacité de réplication autonome et le contrôle de cette réplication. La chimère ou «phasmide»

qui en est résulté est capable, comme on pouvait l'espérer, de se répliquer soit en tant que DNA de λ soit en tant que plasmide. Lorsque l'on fait pénétrer ce DNA dans une bactérie immune vis-à-vis du bactériophage λ , sa partie dérivée de λ est paralysée et la chimère se comporte comme un plasmide : le DNA se circularise et est transmis à la descendance, à laquelle il confère la résistance à la pénicilline si l'on a «marqué» le mini-F en lui adjoignant le gène approprié. Par contre, si ce DNA infecte une bactérie sensible au phage λ , il se comporte comme un DNA de λ , qui peut selon les cas lysogéniser la bactérie (voir la section I de ce chapitre) ou se multiplier en donnant lieu à la production de nombreuses particules de phage λ .

Les méthodes génétiques et biochimiques mises au point pour l'étude du bactériophage λ ont donc pu être utilisées pour l'analyse du mini-plasmide F5. En particulier, le groupe de M. Couturier a sélectionné de multiples mutants affectés dans la réplication et le contrôle de la réplication plasmidique, ainsi que dans le mécanisme qui dirige la répartition des répliques plasmidiques dans la descendance. L'étude génétique et biochimique de ces mutants permet l'analyse des principaux aspects de la relation hôte-plasmide et devrait rendre possible l'identification des points stratégiques pour l'élimination sélective des plasmides nuisibles à l'homme et à son environnement.

Cette étude laisse augurer d'importants progrès dans le domaine de l'épidémiologie des plasmides vecteurs de résistances aux antibiotiques et de déterminants de pathogénicité.

Section 2.— *Clonage de gènes humains dans des plasmides bactériens* (*)

On trouvera dans le chapitre (Titre V) de J. P. Lecocq une excellente mise au point sur l'ingénierie génétique – mise au point qui nous permettra de présenter cette section de manière plus concise.

On sait à quel point une série de connaissances ont cristallisé brusquement autour de la découverte des enzymes de restriction (Arber, Meselson, ...), engendrant ainsi une puissante méthodologie d'analyse et de manipulation du DNA. Peut-être n'est-il pas hors de propos de rappeler ici que plusieurs aspects cruciaux de cette méthodologie sont dus à l'école de Brachet. J'en citerai trois :

(*) (Travail du groupe A. BOLLEN-A. HERZOG).

1) La notion même du rôle joué par les acides ribonucléiques dans la synthèse des protéines. La clé de voûte de la biologie moléculaire et, partant, du génie génétique, reste l'idée que dans l'immense majorité des cas, l'information suit le chemin :



Le rôle de pionniers joué par J. Brachet et R. Jeener dans ce domaine est bien connu.

2) L'isolement d'un gène d'organisme supérieur passe presque toujours par l'isolement de son RNA messenger spécifique. Faut-il rappeler que le tout premier *isolement d'un mRNA spécifique*, celui de l'hémoglobine de lapin, a été réalisé ici sous la direction de H. Chantrenne par A. Burny et G. Marbaix (1964)? Peu après, G. Marbaix donnait, en collaboration avec J. Gurdon la démonstration irrécusable de ce que ce mRNA contient bien l'information concernant la séquence des acides aminés de l'hémoglobine de lapin : son injection dans des oocytes de crapaud (*xenopus*) y induit la synthèse d'hémoglobine *de lapin*.

3) Enfin, l'une des opérations les plus fréquemment utilisées dans le domaine du génie génétique est la *dénaturation* (éventuellement suivie de renaturation) du DNA. La dénaturation du DNA a également été découverte ici (THOMAS, 1951, 1953, 1954) : cherchant à calculer le spectre ultraviolet du DNA à partir des spectres de ses constituants, je m'étais aperçu que le spectre du DNA natif était de près de 40% inférieur à la somme des spectres des nucléotides constituants. Il ne s'agissait pas d'une erreur dans l'estimation des spectres des nucléotides car après hydrolyse du DNA on retrouve le spectre calculé. Il apparut rapidement qu'une large part de cet effet «hyperchrome» peut être obtenu dans des conditions très douces, qui excluent toute rupture des liaisons phosphoester entre nucléotides. Une analyse plus approfondie a montré que l'effet hyperchrome traduisait la destruction d'un ensemble d'interactions secondaires entre les bases azotées constitutives du DNA. Ainsi étaient mis en évidence l'existence d'une structure secondaire et son effondrement (dénaturation) sous l'effet d'agents doux. L'effet exact de la dénaturation a été compris après la découverte par Crick et Watson de la structure en double hélice du DNA : l'effondrement de la structure secondaire peut entraîner la séparation des deux chaînes.

**

Après avoir fourni une importante contribution à l'étude génétique et biochimique de la structure et des fonctions des *ribosomes* le groupe Bollen-Herzog s'est orienté résolument vers le génie génétique et, plus particulièrement, le clonage des gènes humains dans des microorganismes.

Il s'agit particulièrement de facteurs du sérum qui interviennent dans des processus de grand intérêt thérapeutique, comme la coagulation sanguine, la résorption des caillots sanguins et l'intégrité des alvéoles pulmonaires.

Le groupe, dont les activités dans le domaine remontent à seulement deux ans, a d'ores et déjà cloné l'entièreté du cDNA de l' α -antitrypsine et de l'haptoglobine et des segments importants des cDNA de l'antithrombine III et de l'urokinase.

L'une des forces du groupe a été de s'adjoindre d'emblée un groupe de synthèse organique (dirigé par le Dr. A. Cravador) qui produit des polynucléotides de séquences définies pouvant servir de sondes pour identifier des sections intéressantes de cDNA (ou de DNA génomique), d'amorces pour la synthèse de DNA dicaténaire par les polymérases ou de joints pour l'élaboration de plasmides d'expression. En outre, le groupe bénéficie de l'appoint d'un immunologiste de valeur (P. Hérion, formé par le Professeur J. Urbain) pour la construction des lignées d'hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux dressés contre des protéines de plasma. Actuellement, des anticorps monoclonaux dressés contre l'urokinase, l'antithrombine III et l' α_2 -antiplasmin ont été produits et caractérisés. Ces anticorps permettront de mettre au point des tests diagnostiques applicables en médecine humaine pour la détection de pathologies liées à la déficience en protéines de plasma. D'autre part, ils serviront à développer des procédés de purification par chromatographie d'affinité des protéines de sérum produites conventionnellement ou par ingénierie génétique.

CHAPITRE IV

LA FUSION CELLULAIRE, OUTIL D'ANALYSE DE LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES DE MAMMIFÈRES (*)

Les développements récents de la biologie nous ont réservé bien des surprises. L'une des plus spectaculaires est sans conteste la fusion

(*) (Travail de J. et C. SZPIRER).

cellulaire, découverte par Barski et rapidement transformée par Ephrussi, Harris, Weiss ... en un puissant moyen d'investigation. Dans des conditions appropriées, on peut fusionner deux cellules, qu'elles soient semblables, qu'elles proviennent de tissus différents d'un même organisme, ou même d'espèces différentes. L'extraordinaire ne réside pas dans la fusion elle-même, mais dans le fait qu'après la fusion des cytoplasmes, les noyaux puissent fusionner et mettre en commun les chromosomes d'espèces différentes. On obtient ainsi des lignées cellulaires viables dont le patrimoine héréditaire dérive de deux organismes qui peuvent être très différents.

C'est ainsi qu'on forme couramment des hybrides entre cellules humaines et cellules de souris. Si chacun des deux types cellulaires de départ possède une anomalie génétique, on pourra souvent sélectionner une lignée hybride où l'anomalie d'origine humaine sera corrigée par le gène normal correspondant de souris, et *vice versa* ; dans des conditions appropriées, cette lignée sera viable, contrairement aux deux lignées parentales.

La formation d'hybrides entre espèces assez éloignées comme l'homme et la souris ne procède pas d'un désir de sensationnel. L'un de ses intérêts est le fait que les chromosomes humains tendent à être perdus au cours des générations ; la corrélation entre la perte d'un caractère humain et celle d'un chromosome déterminé permet dès lors la localisation sur ce chromosome du gène considéré.

Le groupe de Josiane et Claude Szpirer utilise la méthode d'hybridation cellulaire avec un réel succès pour l'étude des mécanismes de la différenciation des cellules hépatiques. L'un des points importants qui émerge de ce travail est l'identification de mécanismes de contrôle distincts régissant la synthèse de différentes protéines sériques. Ainsi, comme dans la plupart des cas étudiés jusqu'ici, on observe pour l'albumine et l' α -foetoprotéine (AFP) une *extinction* de la synthèse après fusion d'une cellule d'hépatome (productrice) et d'un fibroblaste (non producteur). Mais le 3^e composant du complément (C3) se comporte de manière radicalement différente : non seulement sa synthèse par les chromosomes du parent producteur n'est pas éteinte dans l'hybride, mais le génome du parent non exprimant est activé et participe aussi à la production de C3. Si la synthèse d'AFP par une lignée d'hépatome est éteinte après fusion avec un fibroblaste, elle ne l'est pas après fusion avec une lignée d'hépatome non productrice, ou avec des hépatocytes adultes normaux (non

producteurs) : ce sont donc des mécanismes différents qui font que cette protéine n'est pas synthétisée par les fibroblastes d'une part, et par les hépatocytes adultes ou certaines lignées hépatiques d'autre part.

Une des originalités du travail de Szpírer a consisté à utiliser comme cellules productrices de protéines sériques, non seulement des cellules provenant d'hépatomes, mais aussi des cellules diploïdes normales. Ils ont pu montrer que les résultats obtenus sur les hépatomes se retrouvent dans le cas de cellules normales ; ils ne sont donc pas dus au caractère anormal des premières.

L'analyse des mécanismes s'est beaucoup raffinée depuis que l'on peut utiliser les techniques récentes qui permettent de vérifier directement la présence ou l'absence d'un gène ou d'un messenger. L'usage de sondes spécifiques de tel ou tel gène a permis au groupe Szpírer de montrer, dans plusieurs cas, que le contrôle se produit au niveau de la transcription (on ne trouve pas de RNA messenger de l'albumine ou de l'AFP dans les hybrides où la synthèse de ces protéines est éteinte) et que l'absence de ces synthèses n'est pas due simplement à la perte du gène !

Enfin, il faut mentionner l'important acquis que constitue la formation d'«hybridomes» de cellules hépatiques : partant de cellules de foie synthétisant activement une certaine protéine, mais incapables de survivre en culture, ils ont pu «immortaliser» cette synthèse protéique par fusion avec une cellule d'hépatome.

Nous reviendrons à certains aspects de ce travail dans le chapitre consacré à l'analyse théorique des mécanismes de contrôle (Titre XV).

RÉFÉRENCES

- The Microbial World, Stanier, Doudouroff and Adelberg, 1976.
«Phage Mu : transposition as a life-style», A. TOUSSAINT et A. RÉSIBOIS dans
«Movable Genetic Elements» ed. J. A. Shapiro, Academic Press, 1982,
chapitre 3, pp. 105-158.
-

Titre V

Génie génétique : Bilan & perspectives

INTRODUCTION

Les premières recombinaisons de DNA *in vitro* ont été réalisées il y a seulement quelques années ; c'est, en effet, en 1972-74, que Berg, Boyer, Cohen, ... ont réalisé leurs premières expériences.

Les scientifiques ont rapidement compris la puissance de ces nouvelles techniques qui leur permettaient d'aborder des problèmes qui paraissaient jusque là, totalement insurmontables ; je ne citerai qu'un exemple : l'analyse du génome des organismes supérieurs.

Mais l'évolution prodigieuse de ces nouvelles techniques fit rapidement apparaître, dans un monde où la situation économique devenait de plus en plus difficile, un intérêt considérable du point de vue industriel : en effet, à la faculté d'analyser les gènes s'ajoutait la capacité d'agir sur leur expression ; en d'autres termes, il devenait possible de faire synthétiser, en grandes quantités et à très bas prix, par des microorganismes, des substances que l'on ne possédait, jusque là, qu'en quantité infime ou dont le prix de revient était très élevé.

Cette diversité d'applications tant du point de vue fondamental qu'industriel, provoqua une véritable ruée du monde scientifique vers cette nouvelle technologie. C'est ainsi qu'actuellement, le génie génétique est pratiqué par plusieurs centaines de laboratoires de par le monde et constitue véritablement la pierre angulaire d'une science en pleine expansion.

Mais je crois qu'il est utile de rappeler ici, surtout lorsque l'on va parler d'applications, que le génie génétique, tel qu'il est pratiqué actuellement, est la résultante d'une recherche fondamentale intense menée depuis de nombreuses années ; cette recherche fondamentale qui visait à comprendre la structure et le fonctionnement des gènes, a

amené un à un les concepts, outils et techniques qui permettent actuellement d'isoler et de manipuler les gènes.

LE GÉNIE GÉNÉTIQUE : UNE GRANDE MAITRISE TECHNIQUE

Le génie génétique est en fait fondé sur un petit nombre d'opérations, essentiellement trois :

1) Découpage du DNA en fragments bien définis ; ceci est devenu facile grâce à la découverte des enzymes de restriction, enzymes qui coupent le DNA en des sites spécifiques.

2) Recollage des fragments de DNA ; cette soudure est également effectuée par enzymes appelées ligases. En général, les fragments de DNA sont immédiatement intégrés dans des vecteurs qui sont des bactériophages, plasmides ou virus d'organismes supérieurs, construits à cet usage ; ces vecteurs ont la propriété de se répliquer et peuvent dès lors prendre en charge la propagation d'un autre fragment de DNA dans une cellule hôte.

3) Introduction des molécules de DNA recombinants dans des cellules réceptrices.

La figure 1 nous montre une expérience qui est devenue maintenant un classique du génie génétique.

Il n'existe actuellement aucun obstacle technique à la recombinaison de fragments de DNA provenant d'espèces quelconques. C'est d'ailleurs cette capacité de former un nombre infini d'hybrides, portant chacun une information «originale», qui souleva les nombreuses discussions autour de ce que l'on a improprement appelé les manipulations génétiques ; les scientifiques ont été amenés à préciser les modalités d'xpérimentation et à établir des «guide lines» (conférence d'Asilomar, 1975). Suite aux nombreuses études qui en découlèrent, la sévérité de ces règles de conduite a progressivement été réduite dans la plupart des pays.

Ainsi, le biologiste peut maintenant intégrer n'importe quel gène dans une cellule-hôte et modifier à sa guise son expression. Mais il est utile d'insister sur le fait que les techniques du génie génétique permettent *avant tout* au biologiste de repérer et d'isoler un gène au milieu des centaines de milliers de gènes qui constituent le patrimoine héréditaire d'un organisme supérieur. En effet, ces nouvelles techniques associées à celles de la microbiologie classique (étalement sur un milieu à deux dimensions, pour n'en citer qu'une) permettent au

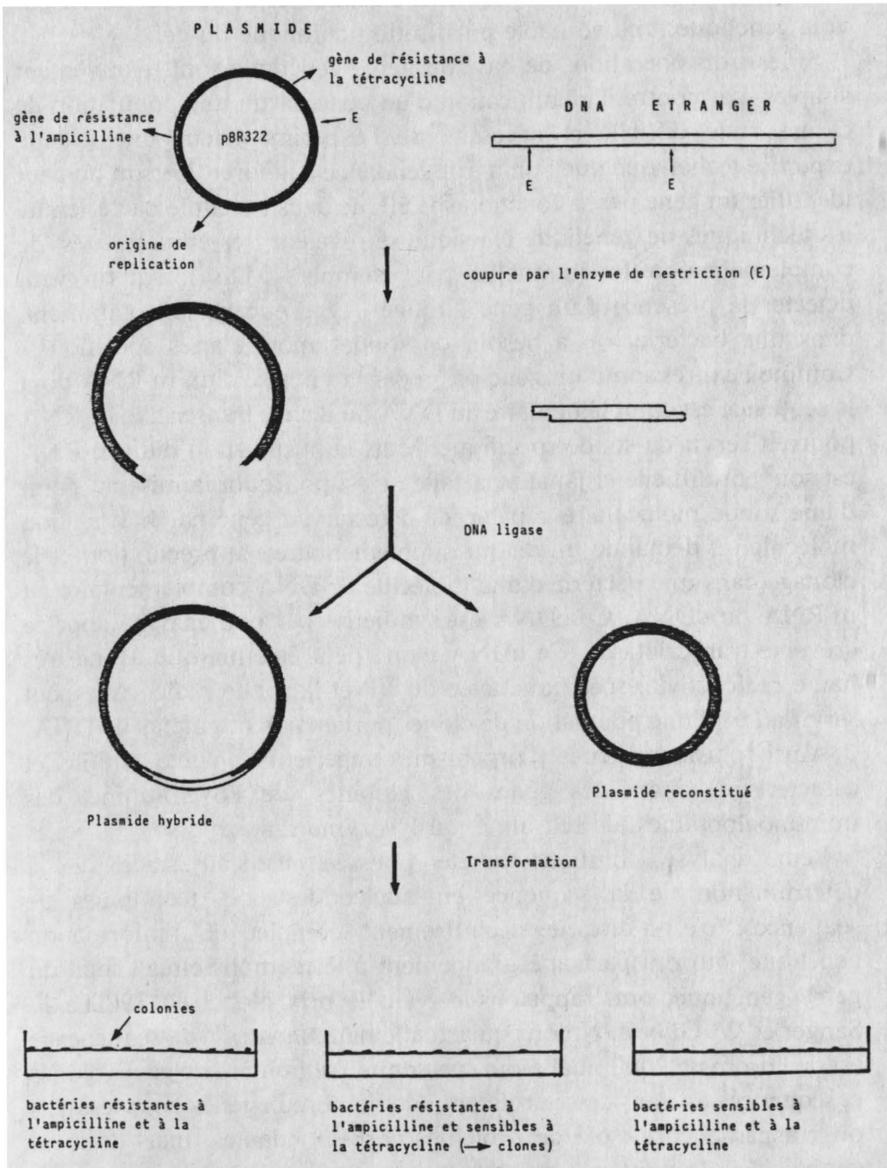


FIGURE 1.- Expérience classique du génie génétique : intégration de DNA étranger dans un plasmide.

biologiste de «cloner» tout fragment de DNA et de réaliser ainsi, par voie génétique, une véritable purification chimique du gène.

Si les trois opérations de base du génie génétique sont relativement simples, par contre, l'identification d'un gène parmi une population de clones reste difficile et nécessite de l'expérimentateur une grande expertise technique que l'on a trop tendance à ignorer. Lorsqu'on peut identifier un gène par sa fonction spécifique dans la cellule bactérienne, les techniques de génétique classique se révèlent très efficaces (test de complémentation fonctionnelle, par exemple). Mais lorsqu'on veut détecter la présence d'un gène étranger, type eucaryote notamment, dans une bactérie, on a besoin de sondes moléculaires spécifiques. Comme l'expression d'un gène passe par la synthèse d'un m-RNA dont la séquence est complémentaire au DNA où il a été transcrit, le m-RNA pourrait servir de sonde spécifique. Mais la purification d'un m-RNA est souvent difficile et jamais parfaite ; c'est pourquoi la mise au point d'une sonde moléculaire capable de détecter un gène par hybridation moléculaire, demande un détour supplémentaire : la préparation et le clonage dans une bactérie d'une molécule de DNA complémentaire au m-RNA ou cDNA. Ce cDNA est synthétisé par une enzyme appelée «reverse transcriptase». Ce cDNA cloné peut être marqué à une très haute radioactivité spécifique avec du ^{32}P et la sonde radioactive peut servir au tri d'une population de clones porteurs de fragments de DNA.

Ainsi, plusieurs gènes d'organismes supérieurs ont été purifiés et caractérisés : citons les gènes des globines, de l'ovalbumine, des immunoglobulines, de l'insuline, du lysozyme, ...

Leur analyse chimique a été poussée jusqu'au stade de la détermination de la séquence en nucléotides ; ces techniques de séquences, c'est-à-dire le déchiffrement complet de l'information génétique, qui ont participé grandement à l'accomplissement total du génie génétique, ont, rappelons-le, valu le prix Nobel en 1980 à F. Sanger et W. Gilbert. Notons qu'actuellement, la vitesse de séquençage est de l'ordre de 2000 nucl./jour/personne. Le nombre de gènes clonés et séquencés est sans cesse croissant ; de nombreux gènes pour lesquels on n'a pas encore isolé de protéines correspondantes (mais dont on connaît déjà la séquence en acides aminés à partir de la séquence du gène) sont régulièrement identifiés. Il est important de signaler ici le rôle crucial de l'ordinateur lors de ces études. L'ordinateur permet, en effet, d'analyser très facilement et très rapidement les nombreuses séquences composées parfois de plusieurs dizaines de milliers de

nucléotides ; l'ordinateur sera sans aucun doute, et ce dans un avenir proche, un outil central et absolument nécessaire de tout laboratoire pratiquant le génie génétique.

C'est la comparaison entre les structures du cDNA et du gène natif, c'est-à-dire porté par le chromosome, qui a apporté l'une des plus grandes découvertes de ces dernières années : la plupart des gènes des organismes supérieurs sont discontinus ; ils sont constitués de régions codantes et non-codantes que l'on appelle respectivement exons et introns. (Fig. 2).

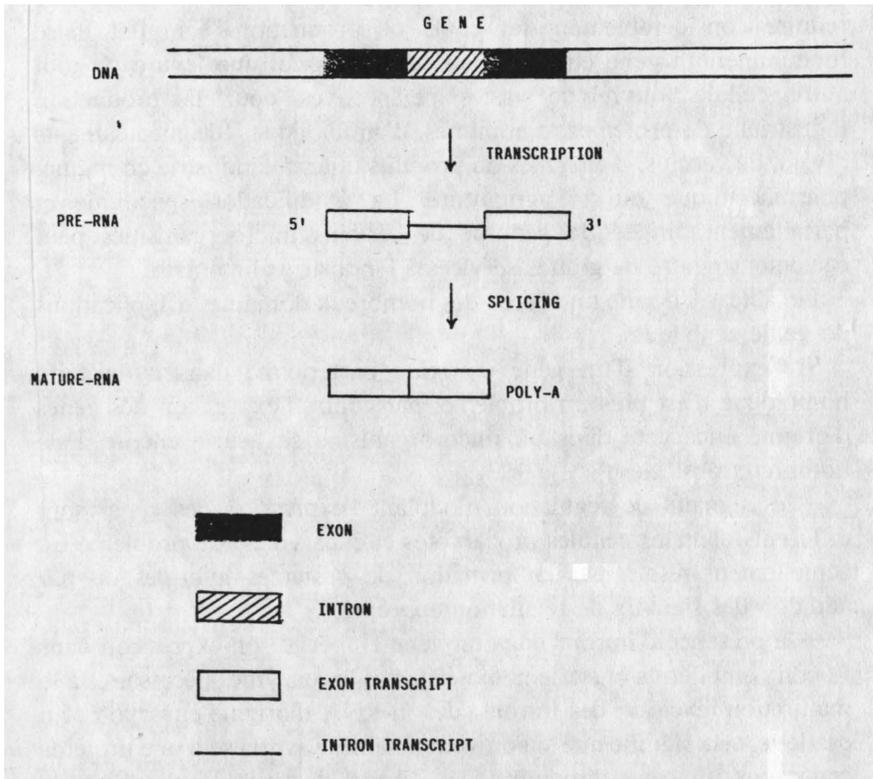


FIGURE 2.- Synthèse d'un m-RNA à partir d'un gène fragmenté.

Ainsi, grâce au génie génétique, nos connaissances du génome des organismes supérieurs ont fait un bond considérable. Je ne citerai qu'un exemple : les altérations génétiques responsables de certaines maladies héréditaires comme les thalassémies ont été parfaitement caractérisées

au niveau du DNA. Plusieurs groupes ont récemment développé un diagnostic moléculaire basé sur la connaissance de ces altérations. Il ne fait aucun doute que ce type de diagnostic sera étendu à d'autres maladies héréditaires dans les prochains mois.

LES APPLICATIONS INDUSTRIELLES

Comme nous l'avons dit dans l'introduction, un des buts principaux est de forcer l'expression d'un ou plusieurs gènes de façon à provoquer la production massive de certaines substances et de permettre ainsi de réduire considérablement les coûts de production. En effet, faire fonctionner un gène étranger dans une bactérie, une levure ou tout autre cellule, ouvre de vastes perspectives pour la production industrielle de protéines, d'hormones, d'antibiotiques, de médicaments divers, de vaccins, d'enzymes ou produits utiles à l'industrie chimique, pharmaceutique ou à l'agriculture. La modification spécifique et parfaitement dirigée du génome de certains microorganismes peut également rendre de grands services à l'industrie alimentaire.

Le tableau I donne un aperçu des nombreux domaines d'applications du génie génétique.

Si l'expression d'un gène d'origine bactérienne dans la bactérie homologue n'est plus un problème, par contre l'expression des gènes d'origine eucaryote dans un microorganisme se heurte encore à de nombreux obstacles :

- les signaux de régulation modulant l'expression des gènes sont différents dans les cellules procaryotes et eucaryotes. Ce problème est actuellement résolu par la formation de protéines hybrides ou par addition des signaux de régulation appropriés.

- la présence d'introns dans un gène empêche son expression dans *E. coli* ; en effet, la bactérie ne possède pas les enzymes nécessaires à la maturation (excision des introns) des m-RNA d'origine eucaryote. En pratique, cela signifie que si l'on veut obtenir la synthèse d'une protéine codée par un gène discontinu dans une bactérie, il faut utiliser la version continue du gène c'est-à-dire le cDNA, et lui ajouter les signaux de commande adéquats.

- certaines protéines d'organismes supérieurs subissent après leur synthèse des modifications que la bactérie ne peut réaliser (glycosylation par exemple) ; ces modifications peuvent jouer un grand rôle dans l'antigénicité de la protéine.

– la protéine étrangère synthétisée par le microorganisme est parfois dégradée sans que l'on sache contrôler le phénomène.

TABLEAU I
Applications du génie génétique (*)

Produit ou procédé	Utilisation
<i>Agriculture</i>	
Acides aminés, vitamines	Additifs alimentaires (lysine par ex.)
Antibiotiques	Additifs alimentaires et prophylactiques
Peptides	Additifs alimentaires et facteurs de croissance
Insecticides	Contrôle des parasites
Fixation de l'azote	Fertilisation
Biodégradation	Dépollution
<i>Chimie</i>	
Composés aromatiques	Intermédiaires chimiques
Composés aliphatiques	Intermédiaires chimiques
Enzymes	Nouveaux procédés de fabrication
Biodégradation	Dépollution
Mineral leaching	Concentration de l'uranium
Biophotolyse	Production d'hydrogène
<i>Industrie alimentaire</i>	
Acides aminés, vitamines	Arômes, additifs alimentaires
Composés aromatiques	Additifs alimentaires
Composés aliphatiques	Additifs alimentaires
Peptides	«Sweeteners» artificiels
Enzymes	Nouveaux procédés de fabrication
Transformation de la cellulose	Production de sucre
<i>Industrie pharmaceutique</i>	
Acides aminés, vitamines	Solutions intraveineuses
Composés aromatiques	Narcotiques, analgésiques, ...
Modification des stéroïdes	Usages thérapeutiques & prophylactiques
Antibiotiques et modification des antibiotiques	Contrôle des maladies infectieuses
Peptides	Contrôle hormonal
Enzymes	Nouveaux procédés diagnostics (par ex. glucose oxydase) et thérapeutiques (par ex. urokinase)
Antigènes viraux	Vaccins (par ex. contre l'hépatite B)
Autres protéines	Nouveaux agents thérapeutiques (par ex. interféron)
Gènes	Contrôle des maladies héréditaires

(*) Applications notées par ordre alphabétique.

LES NOUVEAUX DÉVELOPPEMENTS

Nous assistons actuellement au développement prodigieux de deux domaines qui, tout en permettant de résoudre bien sûr les problèmes énoncés ci-dessus, donnent véritablement l'élan final aux techniques de génie génétique.

A. *La chimie du DNA.*

Les synthèses chimiques d'oligonucléotides ont fait des progrès considérables ces derniers mois grâce à l'avènement des techniques sur phase solide. Actuellement, il est aisé, pour un groupe expérimenté, possédant *tout* le matériel de base, d'obtenir un oligonucléotide de 15-21 nucléotides en quelques jours ; les étapes limitantes sont la préparation des nucléosides protégés et dans une moindre mesure la purification et la caractérisation de l'oligonucléotide synthétisé.

Outre l'intérêt de synthétiser un gène complet (ceci a déjà été réalisé pour la somatostatine, l'insuline et récemment pour l'interféron), ces techniques permettent de synthétiser des oligonucléotides qui :

- servent de «linkers» (segments de liaison) entre fragments de DNA.
- sont des signaux de régulation
- servent de «primers» (amorces) spécifiques pour la synthèse de cDNA.
- permettent de créer des mutations.
- ...

Ces techniques deviennent de plus en plus accessibles (mise au point de machines automatiques) et laissent prévoir une utilisation massive dans les prochains mois.

B. *Nouveaux systèmes de clonage et d'expression.*

Le développement de nouveaux vecteurs permet de véhiculer un gène dans un grand nombre de cellules-hôte différentes et dès lors d'étudier son fonctionnement dans des environnements génétiques variés. Il en résulte également de nombreux avantages du point de vue industriel :

- production de protéines à l'état natif c'est-à-dire modifiées.
- choix des microorganismes les plus adéquats pour l'industrie

- modification des microorganismes déjà utilisés en fermentation industrielle.
- élimination de certaines endotoxines, ...

La mise au point de systèmes de clonage et d'expression dans des microorganismes autres que *E. coli* est en plein développement ; les succès récents obtenus chez *Bacillus subtilis*, la levure ou *Pseudomonas* montrent clairement l'importance de ces nouvelles techniques pour l'industrie de demain.

La construction de vecteurs dans les cellules animales et végétales bat également son plein ; j'en dirai seulement quelques mots :

- l'analyse d'une bactérie, *Agrobacterium tumefaciens*, qui provoque des tumeurs chez certaines plantes, laisse entrevoir l'espoir d'utilisation d'une partie du plasmide Ti comme vecteur de transfert chez les plantes (travaux du groupe SCHELL-VAN MONTAGU à Gand).

- les cellules animales en culture commencent à leur tour à servir de cellules-hôte pour des gènes étrangers. Nous citerons comme exemple l'expression du gène australien du virus de l'hépatite B dans des cellules de souris et ce, il est important de le signaler, après transformation simple par du DNA purifié. Des vecteurs d'expression dérivés de certains virus comme le SV40 commencent également à être utilisés.

Ainsi, l'avenir semble promis aux biotechnologies. Mais il ne faut pas oublier que «expression d'un gène» ne signifie pas application industrielle immédiate. La purification du produit, par exemple, par des méthodes applicables industriellement ainsi que, dans certains cas, les tests d'approbation légaux resteront des étapes difficiles à franchir, et probablement aussi longues, sinon plus longues, que les recherches ayant abouti à l'expression initiale. L'aboutissement sera sans aucun doute la résultante de la complémentarité entre le génie génétique et deux autres domaines également en pleine expansion : l'immunologie (anticorps monoclonaux) et le génie enzymatique (enzymes et cellules immobilisées).

CONCLUSION

Il est clair que le génie génétique n'a exprimé, à ce jour, qu'une faible partie de son potentiel ; l'impact sur la bio-industrie, et sur la qualité de la vie en général, de ce qu'on peut appeler le génie génétique de «seconde génération», sera considérable et nous assisterons dans les prochaines années à de profonds bouleversements qui sont même difficiles à imaginer actuellement.

RÉFÉRENCES

- P. CHAMBON, «Spliced genes». *Scientific American* 244, 60-71 (1981).
- K. J. DENNISTON & L. W. ENQUIST.— «Recombinant DNA», Dowden, Hutchinson & Ross Inc. *Benchmark Papers in Microbiology* V. 15 (1981).
- L. GROSSMAN & K. MOLDAVE.— «Methods in Enzymology». Vol. 65, part. I. Academic Press (1980).
- P. KOURILSKY.— «Le Génie Génétique». *La Recherche* 110, 390-492, Vol. 11 (1980).
- J. DE ROSNAY.— «Biotechnologies et Bio-Industrie» Seuil/La Documentation Française (1979).
- J. K. SETLOW & A. HOLLAENDER.— «Genetic Engineering, Principles & Methods», Vol. 1, Plenum Press (1979).
- , «Genetic Engineering, Principles & Methods» Vol. 2, Plenum Press (1980).
- R. WILLIAMSON.— «Genetic Engineering», Vol. 1, Academic Press (1981).
- , «Genetic Engineering», Vol. 2, Academic Press (1981).
- R. WU.— «Methods in Enzymology», Vol. 68, *Recombinant DNA*, Academic Press (1979).
-

M. Laurent, M. Lheureux, E. Pays, M. Steinert,
S. Van Assel

Titre VI

Organisation et expression des génomes nucléaire et mitochondrial des trypanosomides

RÉSUMÉ

Les trypanosomes pathogènes africains sont les agents étiologiques de la maladie du sommeil chez l'homme et d'affections mortelles du bétail. Les recherches de notre laboratoire ont porté sur la structure du DNA kinétoplastique, cible de plusieurs médicaments trypanocides, et sur l'organisation et l'expression du génome nucléaire de ces trypanosomes. Elles ont révélé notamment les mécanismes moléculaires de la variation antigénique qui permet au parasite d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

Grâce à des sources nouvelles de subvention de la recherche en faveur des régions les moins favorisées du globe, en particulier grâce au Programme Spécial de Recherche et de Formation concernant les maladies tropicales (PNUD/Banque Mondiale/OMS), on a pu assister ces dernières années à un développement remarquable de la recherche dans le domaine des maladies tropicales. Ainsi les agents étiologiques de deux affections parasitaires importantes, les *plasmodium* du paludisme et les trypanosomes de la maladie du sommeil ont fait l'objet d'études approfondies. On peut probablement affirmer aujourd'hui que, avec les levures industrielles, les trypanosomes sont les eucaryotes unicellulaires les mieux connus.

Les trypanosomes sont des protozoaires parasites, généralement transmis par la piqûre d'un insecte qui est ainsi le «vecteur» de la maladie, ou trypanosomiase.

Les trypanosomioses sont des parasitoses extrêmement graves. La trypanosomiase humaine africaine est mieux connue sous le nom de

maladie du sommeil en raison de l'encéphalite aiguë et de la somnolence qu'entraîne la prolifération du parasite dans le système nerveux central, dans la phase terminale de la maladie. Selon des estimations récentes de l'Organisation Mondiale de la Santé, 45 millions d'africains y sont exposés au sein d'une vaste région s'étendant approximativement entre les 15^e parallèles nord et sud. Ces limites correspondent en fait à celles de la répartition géographique des glossines ou «mouches tsétsé», vecteurs habituels de la maladie. Le cycle parasitaire complet des trypanosomes se fait par l'alternance d'un développement dans l'appareil digestif de l'insecte vecteur et d'une prolifération dans la circulation périphérique et dans certains tissus de l'hôte vertébré.

La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine, moins connue chez nous mais encore plus pernicieuse, est transmise par un hémiptère réduvidé hématophage ; cette parasitose touche toutes les populations pauvres de l'Amérique tropicale, de l'Argentine jusqu'au sud des Etats Unis (les habitations «en dur» des gens aisés ne conviennent pas à l'insecte vecteur). Le parasite se développe dans les tissus musculaires et produit à son stade terminal une myocardite fatale. Elle est d'autant plus grave que, jusque très récemment, on ne disposait d'aucun médicament efficace pour la combattre.

Enfin, plusieurs espèces de trypanosomes causent des affections létales chez les animaux domestiques, bovins en particulier, et constituent de ce fait un problème économique considérable pour les régions tropicales, de l'Afrique principalement. On estime que plus de 6 millions de km² de ce continent, presque un quart de sa surface, sont rendus impropres à l'élevage par les trypanosomes et leurs vecteurs. Si l'on tient compte de ce que les surfaces restantes sont en majeure partie désertiques, on mesurera toute l'étendue du désastre que représentent ces trypanosomiasés du bétail pour un continent où les carences protéiniques sont endémiques.

Les trypanosomes appartiennent à la très importante classe des zooflagellés (*Zoomastigophora*), organismes eucaryotes unicellulaires souvent très mobiles grâce à la présence d'un flagelle. De petite taille, ils n'ont qu'un seul noyau mais possèdent un corpuscule, le kinétoplaste qui a parfois été pris pour un second noyau et qui caractérise tout l'ordre (*kinétoplastida*) auquel appartiennent les trypanosomes. Comme nous l'avons montré, il y a une vingtaine d'années, cet organe contient et synthétise un acide désoxyribonucléique (DNA) qui lui est propre et

il fait partie intégrante de l'unique mitochondrie du trypanosome. Ainsi, c'est chez ces organismes que le DNA mitochondrial a été découvert et décrit pour la première fois.

Il nous avait semblé au départ que l'abondance exceptionnelle de ce DNA dans le kinétoplaste devait en rendre l'étude plus facile et que les trypanosomes et quelques genres apparentés seraient un matériel de choix pour des recherches sur la structure moléculaire et sur l'expression d'un génome cytoplasmique. C'est pour cette raison que nous avons consacré de nombreuses années de recherches à l'étude de ce DNA mitochondrial ou «kinétoplastique» des trypanosomes. A mesure que le travail progressait, il apparut cependant que l'organisation moléculaire du DNA de kinétoplaste (kDNA) des trypanosomes était extrêmement différente et beaucoup plus complexe que celle du DNA mitochondrial des autres organismes eucaryotes. Chaque kinétoplaste contient en effet un «réseau» de forme discoïdale, constitué de 10.000 à 20.000 «minicercles» de DNA concaténés. Ces minicercles, mesurant de 0.3 à 0.8 μm de circonférence selon les espèces, sont les plus petites molécules naturelles connues de DNA. La réplication et la ségrégation de ce kDNA au cours du cycle cellulaire pose évidemment des problèmes uniques, qui ont fait l'objet de recherches dans notre laboratoire comme à l'étranger. D'autre part, des études pharmacologiques mettaient en évidence la très grande sensibilité du DNA de kinétoplaste à certains colorants dont les propriétés trypanocides avaient été découvertes empiriquement : le kinétoplaste apparaissait donc comme une cible potentielle pour la chimiothérapie des trypanosomiasés, ce qui ajoutait à l'intérêt de son étude.

Paradoxalement, alors que les minicercles sont très abondants dans le kinétoplaste, avec le temps, l'idée qu'ils pouvaient porter les gènes de RNAs et de protéines mitochondriales devenait de plus en plus difficile à soutenir en raison surtout de la très grande variabilité de leur séquence, mise en évidence par l'absence quasi totale d'hybridation moléculaire interspécifique. En outre, comme on pensait généralement que les minicercles d'une espèce donnée étaient tous identiques, leur très petite taille offrait bien peu de place à l'information génétique. C'est à ce moment qu'une nouvelle espèce moléculaire de DNA a été découverte dans le kinétoplaste : le maxicercle. Parfois libre, mais souvent associé par concaténation au réseau de minicercles, ce nouvel élément apparaissait comme un candidat beaucoup plus probable pour le génome mitochondrial des trypanosomes. C'est peu de temps après la

découverte du maxicercle chez le trypanosomide *Crithidia luciliae* que commence la période couverte par la présente revue des travaux effectués dans notre laboratoire.

Nous avons recherché et caractérisé cette espèce moléculaire chez d'autres trypanosomides et nous avons poursuivi, chez différentes espèces, nos observations sur l'organisation et la réplication du DNA de kinétoplaste. Les caractères très exceptionnels de ce DNA de kinétoplaste ont fait que le génome nucléaire des trypanosomes est longtemps resté dans l'oubli. Nous avons commencé l'étude de ce dernier par une recherche de séquences répétées ; nous avons ensuite examiné l'organisation des gènes des RNAs ribosomiques 18S et 28S. Nous avons enfin et surtout entrepris une étude approfondie des gènes codant pour les antigènes de surface ou antigènes «variables», des trypanosomes pathogènes africains.

*Recherches sur le génome mitochondrial (ou kinétoplastique)
des trypanosomides*

1) *Courbes de fusion et distribution des bases au sein du kDNA.*

Dans notre laboratoire comme à l'étranger, les analyses par centrifugation à l'équilibre en gradients de densité de DNAs kinétoplastiques de nombreuses espèces avaient montré que ces DNAs sont relativement riches en adénine-thymine (A-T). Nous avons vérifié ces observations en mesurant la température de fusion de ces kDNAs et nous nous sommes employés à accroître considérablement la définition des courbes de fusion de manière à en tirer des informations sur la distribution des bases au sein des molécules de kDNA. Pour cela, nous avons réalisé un instrument extrêmement sensible en couplant un micro-ordinateur à un spectrophotomètre à lecture digitale. Une table traçante enregistre directement la courbe différentielle de fusion. Les courbes obtenues pour tous les échantillons de kDNA examinés ont montré plusieurs pics qui révèlent l'existence de domaines distincts, plus ou moins riches en A-T, dont certains ne représentent guère plus de 2 à 3% de l'ensemble du DNA. Ces profils différentiels de fusion sont remarquablement reproductibles et caractéristiques des différentes espèces que nous avons étudiés : *Crithidia luciliae*, *C. fasciculata*, *C. oncopelti*, *Blastocrithidia culicis*, *Trypanosoma mega* et *T. brucei*.

La comparaison de ces profils de fusion permet d'estimer rapidement la parenté des espèces et d'étudier l'évolution de celles-ci : comme nous

le verrons plus loin, ces méthodes moléculaires de la taxonomie sont indispensables dans le cas de trypanosomes. Nous avons pu voir ainsi que les espèces *C. luciliae* et *C. fasciculata* sont relativement voisines et que deux souches de trypanosomes isolées l'une au Zaïre et l'autre en Ethiopie, sont des variétés géographiques de la même espèce. Ces résultats ont été confirmés par des tests d'hybridation moléculaire et par la comparaison des fragments obtenus après digestion du DNA de kinétoplaste par des endonucléases de restriction.

2) *Organisation du kDNA - Microscopie électronique et analyses par les enzymes de restriction.*

L'organisation très complexe du kDNA en réseau comportant des milliers de minicercles et une faible proportion de molécules plus grandes, apparemment aussi circulaires, présentait encore de très nombreux points obscurs. La taille des minicercles apparaissait constante au sein d'une même espèce, ce qui avait fait émettre l'hypothèse qu'ils étaient tous identiques et que la quantité d'information associée à leur séquence devait être extrêmement réduite. Cette hypothèse restait à démontrer. On se demandait aussi si le «maxicercle», qui venait d'être découvert dans le kinétoplaste de *Crithidia luciliae*, était un élément constant du kDNA de toutes les espèces, s'il avait une séquence propre ou s'il était formé de minicercles répétés bout à bout.

Les examens au microscope électronique de kDNAs purifiés ont effectivement démontré l'existence du maxicercle chez toutes les espèces examinées. Sa taille est cependant plus petite chez les trypanosomes (9 μm pour *T. mega*, 6 μm pour les trypanosomes du groupe *T. brucei*) que dans le genre *Crithidia* (12 μm pour *C. luciliae* et *C. fasciculata*).

Ces observations ont été parfaitement vérifiées par l'analyse électrophorétique des mêmes kDNAs digérés par diverses endonucléases de restriction.

De plus, comme cette dernière méthode montrait que les fragments du maxicercle forment toujours des «bandes» distinctes de celles des minicercles, on pouvait en conclure que les séquences respectives de ces deux types de molécules devaient être différentes. Nous sommes arrivés aux mêmes conclusions ultérieurement, par des expériences d'hybridation moléculaire.

L'examen des fragments de restriction des minicercles était lui aussi intéressant : il révélait un nombre de fragments différents très supérieur à celui que prédisait l'hypothèse d'une population homogène de minicercles tous identiques. Ceux-ci n'étaient donc pas tous pareils et cette hétérogénéité apparaissait plus grande chez les trypanosomes que chez les *Crithidia*. Ces résultats étaient en plein accord avec les observations que nous faisons parallèlement sur les cinétiques de réassociation des mêmes kDNAs (voir plus loin).

Nous avons ainsi confirmé l'existence générale du maxicercle dans le kinétoplaste des trypanosomides. En outre, nous avons démontré que, par sa séquence de nucléotides, ce maxicercle est différent des minicercles et que ces derniers sont plus ou moins hétérogènes selon les espèces.

3) complexité cinétique du kDNA.

Le système automatique de mesure de l'absorbance en fonction de la température, que nous avons réalisé pour obtenir la courbe différentielle de fusion des DNAs (voir plus haut), a pu être programmé pour l'étude de la cinétique de réassociation des mêmes DNAs. On sait que la vitesse de réassociation des deux brins d'un DNA dénaturé est d'autant plus grande que la séquence de celui-ci est plus courte et plus souvent répétée. Les observations qui avaient été faites auparavant, dans notre laboratoire et à l'étranger, sur les genres *Crithidia* et *Leishmania*, témoignaient d'une «complexité cinétique» (longueur totale de la séquence sans répétition) un peu supérieure à la circonférence du minicercle. Cette différence était attribuée à l'imprécision de la méthode et on pensait généralement que la même séquence unitaire était répétée dans chacun des minicercles.

Les résultats plus précis et plus fiables que nous avons obtenus avec notre nouvelle instrumentation ont clairement montré que cette interprétation était erronée. Ils montraient d'abord que la complexité cinétique du kDNA varie dans une large mesure selon l'espèce : faible dans le cas des *Crithidia* et autres trypanosomides monoxènes, elle est nettement plus élevée chez *T. mega* et considérable chez *T. brucei*. Il n'y a donc aucune corrélation entre la taille des minicercles et la complexité de leur séquence. Ces observations impliquent l'existence de nombreuses classes de minicercles différents au sein du réseau de kDNA : chez *T. brucei* par exemple, il y en aurait environ 250. Cette très grande hétérogénéité des minicercles pouvait-elle être interprétée comme

reflétant une capacité d'information beaucoup plus grande du kDNA de ces trypanosomes ? Plusieurs observations rendent cette hypothèse très improbable : la très grande variabilité de séquence du minicercle est peu compatible avec la notion d'information génétique et d'ailleurs aucune hybridation n'a pu être observée entre les RNAs totaux ou mitochondriaux des trypanosomes et les minicercles. Alors que les minicercles ne semblent pas être le siège de transcriptions, il a été établi par P. BORST et ses collaborateurs de l'Université d'Amsterdam, que le maxicercle est transcrit et porte notamment les gènes de rRNAs mitochondriaux, ce qui confirme l'hypothèse que nous avons émise que le maxicercle est l'équivalent du DNA mitochondrial des autres eucaryotes.

Une autre observation que nous avons faite sur la cinétique de réassociation du kDNA est que celle-ci est multiphasique, indiquant l'existence de constituants de complexités différentes. Nous avons analysé les courbes obtenues en les comparant à des courbes théoriques obtenues par simulation. Cette analyse fait apparaître deux composants du minicercle dont l'un serait plus répété que l'autre et serait un élément commun à tous les minicercles, éventuellement nécessaire à la réplication ou à la recombinaison de ces molécules. L'hétérogénéité de celles-ci serait le fait de l'autre constituant. L'existence de ces deux composants a été confirmée récemment dans plusieurs laboratoires par la détermination de la séquence complète de minicercles.

4) Emploi de techniques moléculaires dans l'étude de l'évolution et de la taxonomie des trypanosomides.

Les recherches sur l'épidémiologie et l'étiologie des trypanosomiasés se heurtent fréquemment à la difficulté de distinguer les différentes espèces et sous-espèces de trypanosomes par un simple examen au microscope, leurs caractères morphologiques étant trop semblables. Une variabilité de forme liée au cycle parasitaire ajoute encore à la confusion. C'est pour pallier cette difficulté que plusieurs laboratoires cherchent à appliquer les techniques de la biologie moléculaire à la taxonomie des trypanosomes. Les recherches ont été principalement tournées vers l'analyse d'iso-enzymes et, dans notre laboratoire, des acides désoxyribonucléiques. Avec la collaboration des laboratoires du professeur P. Borst (Amsterdam) et du Dr. B. A. Newton (Cambridge), nous avons montré qu'il est possible de distinguer les différentes espèces de trypanosomides par la réaction d'hybridation de leur kDNA

avec des sondes de cRNA radioactives. En effet, on n'observe généralement pas d'hybridation croisée entre espèces différentes. La technique d'hybridation DNA-cRNA *in situ*, sur frottis de trypanosomes, offre ainsi un moyen relativement simple et rapide pour déterminer l'espèce de trypanosomes sur de très petits échantillons. Ce procédé a été utilisé récemment pour la comparaison et la classification de très nombreuses souches de *Leishmania*, un autre trypanosomide pathogène. Malheureusement, cette technique est d'un usage difficile dans le cas des trypanosomes pathogènes africains à cause, probablement, de la très grande hétérogénéité de leur kDNA.

Nous avons cependant poursuivi des recherches comparatives sur les DNAs de trypanosomes : elles apportent des éléments intéressants sur l'évolution de ces DNAs et pourraient éventuellement mettre en évidence des fractions de DNA plus appropriées à la classification «moléculaire» que le kDNA total.

Nous avons comparé les minicercles, les maxicercles et aussi les gènes nucléaires du RNA ribosomique (rDNA) de plusieurs espèces. Pour cela, nous avons fait usage de sondes radioactives préparées par «nick-translation» à partir de fragments clonés de maxicercles de *T. brucei* (avec la collaboration du laboratoire du professeur M. VAN MONTAGU) et de maxicercles entiers isolés directement des trypanosomes. D'autres sondes ont été obtenues par marquage à l'iode 125 des rRNAs 18S et 28S de *T. mega*. Ces sondes s'hybrident avec les séquences correspondantes des autres espèces alors que, comme nous l'avons signalé plus haut, nous n'avons pas pu démontrer d'hybridation interspécifique des minicercles. Les séquences du maxicercle et, comme on pouvait s'y attendre, du rDNA sont donc beaucoup plus conservées que celles des minicercles. Des cartes de sites de restriction ont été obtenues pour les maxicercles et pour le rDNA de *T. brucei* et de deux sous-espèces de *T. mega*. On constate pour ces deux sortes de DNA, que l'évolution n'a pas apporté de bouleversement important de la séquence : les cartes de restriction se ressemblent et les segments homologues se retrouvent, chez ces trois trypanosomes, ordonnés de la même manière. Cependant, même entre les deux sous-espèces géographiques de *T. mega*, on observe des différences ponctuelles au niveau de certains sites de restriction, tant dans le maxicercle que dans le rDNA. Des observations préliminaires ont révélé une divergence plus grande entre les maxicercles de ces trypanosomes et ceux des *Crithidia* : seule une petite partie du maxicercle des *Crithidia* est reconnue par la sonde préparée avec le maxicercle de *T. mega*.

5) Recherches sur le DNA nucléaire des trypanosomides.

Nous avons obtenu les courbes de fusion différentielles du DNA nucléaire de plusieurs espèces de *Crithidia* et de trypanosomes. Ces courbes sont généralement complexes, témoignant de l'existence de plusieurs classes de séquences de composition en bases différentes. Des expériences de fusion sub-totale suivie de réassociation, faites sur du DNA nucléaire découpé en fragments de ± 1300 paires de bases, indiquent que des séquences riches en GC sont présentes dans la plupart de ces fragments et qu'elles alternent donc avec les segments plus riches en A-T dans la plus grande partie du génome. En étudiant successivement la fusion, la réassociation puis une seconde fusion du DNA nucléaire de *T. brucei*, nous avons observé un constituant répétitif riche en A-T dont la renaturation donne lieu à des mésappariements de bases, alors que le reste du DNA se réassocie généralement très fidèlement. L'existence de ces séquences répétées ressort également de nos analyses électrophorétiques des mêmes DNAs digérés par des enzymes de restriction.

Un satellite répétitif lourd, relativement riche en G-C, a été mis en évidence chez *T. mega*. L'analyse des produits de sa dégradation par des endonucléases de restriction montre qu'il est répété «en tandem» (bout à bout), que l'unité de répétition est d'environ 15 kilobases et que chaque cellule en contient environ 200 copies. Nous avons pu démontrer, par des expériences d'hybridation moléculaire, que ce satellite contient les gènes des RNAs ribosomiques 28S et 18S et qu'il représente donc le rDNA de cette espèce. Nous avons mis pareillement en évidence le rDNA de *T. brucei* et des cartes de restriction de ces rDNAs ont été obtenues (cfr. plus haut).

Plus récemment, nous avons entrepris l'étude approfondie de certains gènes nucléaires particulièrement intéressants du trypanosome : ceux qui déterminent la spécificité des antigènes de surface du parasite.

6) Etude des bases génétiques et moléculaires de la variation antigénique des trypanosomes pathogènes.

On sait depuis le début de ce siècle que les trypanosomes pathogènes peuvent entretenir une infection chronique chez l'homme ou le mammifère en dépit de la réaction de défense immunitaire de ceux-ci. Une résistance à la réponse immunitaire n'est pas unique et propre aux

seuls trypanosomes, mais ces derniers en ont perfectionné le mécanisme de façon remarquable. La membrane plasmique qui enveloppe chaque trypanosome est complètement revêtue d'une couche dense de glycoprotéine. Ce revêtement est le seul constituant antigénique du trypanosome vivant que perçoivent les lymphocytes de l'hôte. Lorsque les anticorps dressés contre cet antigène de surface apparaissent dans le sang, peu de jours après le début de l'infestation, ils provoquent la lyse de la quasi totalité des parasites présents dans la circulation. On observe cependant bientôt une rechute accompagnée d'un nouvel accroissement de la population de trypanosomes, ceux-ci étant maintenant résistants aux anticorps dressés contre la population initiale. L'étude du revêtement antigénique a montré que la seconde population possède un antigène de surface nouveau, qui n'est pas reconnu par ces anticorps. Cette variation antigénique peut se répéter un grand nombre de fois et permet aux trypanosomes de se maintenir suffisamment longtemps dans l'hôte mammifère pour assurer le bouclage de leur cycle parasitaire assez complexe.

La variation antigénique des trypanosomes africains fait, depuis plusieurs années, l'objet de recherches dans de nombreux laboratoires d'Europe, d'Afrique et des Etats Unis. Une contribution majeure à ces recherches est celle apportée par l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers. Des chercheurs de cet Institut ont démontré que la variation antigénique se produit dans une population clonée de trypanosomes et qu'une telle population possède un «répertoire» de plusieurs dizaines de types antigéniques différents. Ils ont isolé des clones de ces différents «variants» antigéniques et en ont purifié les antigènes de surface pour les caractériser. Sans le patient travail et la collaboration de ces chercheurs, nos propres recherches n'auraient pas été possibles.

Au moment où nous avons entrepris cette étude, les mécanismes moléculaires de la variation antigénique étaient presque totalement inconnus ; on savait seulement que les déterminants antigéniques impliqués appartenaient à des glycoprotéines de surface et que celles-ci étaient différentes chez des trypanosomes de sérotypes différents. Le premier objectif de notre travail était de répondre aux deux questions fondamentales suivantes : chaque antigène d'un répertoire est-il «codé» par un gène particulier ? Dans l'affirmative, l'expression séquentielle de ces gènes est-elle contrôlée au niveau de leur transcription ? Il nous fallait pour cela explorer les ARN messagers (mRNAs) et aussi les gènes d'au moins deux variants antigéniques distincts. Des sondes

radioactives spécifiques étaient indispensables et devaient être préparées à partir des mRNAs des antigènes de surface de ces variants.

Préparation des sondes A1 et A8.

Nous avons d'abord isolé les polyribosomes totaux de deux variants antigéniques A1 et A8, de *T. brucei brucei*. De ces polyribosomes ont été séparés par immunoprécipitation ceux qui font la synthèse de l'antigène de surface, grâce à l'interaction des chaînes naissantes de cet antigène avec les immunoglobulines d'un immunosérum variant-spécifique homologue. Enfin, de ces immunocomplexes, nous avons extrait les mRNAs. Ceux-ci, ainsi partiellement purifiés, induisent la synthèse de polypeptides dans un lysat de réticulocytes de lapin et l'analyse électrophorétique de ces polypeptides révèle un constituant majeur dont le poids moléculaire, environ 6.3×10^4 , est celui de l'antigène de surface. Ce polypeptide réagit aussi sélectivement avec l'immunosérum homologue. Ces expériences montrent que nous avons bien isolé les mRNAs recherchés. Nous avons aussi pu constater que le RNA messager de l'antigène A8 est absent dans les trypanosomes de sérotype A1 et vice versa, ce qui indique déjà que le contrôle de l'expression des gènes d'antigène de surface pourrait être effectué au niveau de la transcription.

Sur les messagers des antigènes A1 et A8 ont été synthétisés *in vitro* des DNAs complémentaires (cDNA) radioactifs. La méthode mise en œuvre a été considérablement améliorée par l'emploi d'un nouvel inhibiteur de la ribonucléase et ce sont des copies complètes des mRNAs qui ont été obtenues. Ces cDNAs radioactifs peuvent servir de sonde pour identifier les séquences codant pour les antigènes correspondants, mais tant pour les séparer de leurs contaminants que pour les obtenir facilement en quantité pratiquement illimitée, ils ont été clonés dans le système *E. coli*-pBR 322. Ce premier clonage a été réalisé avec la collaboration de chercheurs de l'Université de Strasbourg.

Quatre clones (un dérivé du sérotype A1 et trois dérivés du sérotype A8) ont été retenus et caractérisés : le test d'hybridation-inhibition de la traduction et le test positif de sélection par hybridation du mRNA homologue ont démontré que les DNAs clonés sont bien spécifiques des antigènes A1 et A8. Ils ont alors été étudiés dans le détail par électrophorèse de leurs fragments de restriction. Les cartes de restriction obtenues ne montrent aucune homologie entre les séquences

de ces deux DNAs, suggérant qu'à chaque antigène correspond un gène différent.

Analyse des mRNAs de différents variants au moyen de sondes spécifiques A1 et A8.

Les RNAs totaux ou les RNAs polyadénylés ont été préparés à partir des trypanosomes exprimant les sérotypes A1, A3, A8 et A13. Ces RNAs sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose puis transférés sur papier diazoté. Par hybridation moléculaire avec les sondes de cDNA cloné nous avons observé que les mRNAs spécifiques des antigènes A1 et A8 ne se trouvent que dans les trypanosomes qui expriment le sérotype correspondant. Ces résultats confirment que le contrôle de la synthèse de ces antigènes de surface se situe au niveau de la transcription.

Recherche et caractérisation des gènes d'antigènes de surface.

Les DNAs nucléaires ont été extraits et purifiés à partir de populations clonées des variants A1, A3, A8 et A13. Ces DNAs sont digérés par diverses endonucléases de restriction, les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose puis transférés sur des membranes de nitrocellulose (technique dite des «Southern Blots»). L'hybridation de ces DNAs avec les sondes de cDNA cloné A1 et A8 révèle plusieurs bandes dont la distribution dans le gel, pour une enzyme donnée, est spécifique de la sonde utilisée, confirmant l'hypothèse qu'à chaque antigène correspond une séquence de DNA génomique différente.

En faisant usage de sondes plus petites, correspondant à des fragments spécifiques des séquences clonées, nous avons pu constater qu'en plus du gène lui-même, le génome contient aussi quelques copies plus ou moins incomplètes ou altérées de ce gène, constituant une famille de séquences apparentées.

On constate de plus que les sondes font apparaître une bande additionnelle dans le DNA extrait du variant homologue. Cette bande additionnelle, liée à l'expression, apparaît chez les deux variants étudiés. D'un examen attentif des résultats de plusieurs expériences et d'estimations semi-quantitatives faites sur ce matériel, il ressort clairement que l'expression d'un antigène est liée à la duplication d'une «copie de base» du gène et à la transposition de la copie additionnelle

«liée à l'expression» dans un site différent. Des cartes de restriction ont été obtenues tant pour la copie liée à l'expression que pour la séquence de base.

Enfin, les sondes limitées à l'extrémité 3' de la séquence clonée s'hybrident avec un nombre considérable de fragments de DNA. Cette observation, faite aussi bien avec les sondes A1 et A8, montre l'existence d'éléments de séquence répétés dans un très grand nombre de fragments.

Etude comparée des variants A1 et A1b.

On sait qu'au sein d'une population clonée de trypanosomes, le même sérotype peut réapparaître. Nous nous sommes demandés si cette récurrence d'un même type antigénique est liée chaque fois à la répétition exacte du même processus de duplication-transposition. Le variant A1b sérologiquement identiques à A1, a été obtenu par clonage d'hétérotypes mineurs apparus dans une population clonée de type A10, elle même dérivée du clone A1. En analysant par la méthode des « Southern Blots» les DNAs de A1 et de A1b, nous avons observé que dans les deux cas le même gène de base a été dupliqué et que les copies additionnelles sont transposées dans le même site. Cependant, alors que l'environnement 5' se révèle identique pour les copies additionnelles de A1 et A1b, des expériences montrent que l'extrémité 3' de celles-ci et les séquences flanquantes du côté 3' sont différentes.

Les gènes d'antigènes de surface dans la forme de culture ou procyclique.

Nous avons aussi cherché à savoir ce qu'il advient de la copie additionnelle du gène d'antigène variable lorsque la synthèse de celui-ci s'éteint. Pour cela, nous avons analysé le DNA génomique de formes procycliques, obtenues par la culture *in vitro* du variant A1. Il est établi que la transformation des formes sanguicoles en formes de culture (ou procycliques) s'accompagne de l'arrêt de la synthèse de l'antigène de surface qui, dans le cas de notre étude est de type A1. Les résultats de cette recherche ont montré que l'extinction de l'expression du gène est accompagnée de la perte de sa copie additionnelle. Cette observation suggère que c'est la copie additionnelle du gène qui est transcrite. Il est aussi intéressant de signaler que cette perte se produit bien avant qu'un autre gène d'antigène de surface ne soit exprimé.

Sensibilité à la DNAase de la copie additionnelle du gène d'antigène de surface.

La synthèse du mRNA d'un antigène de surface pourrait se faire par la transcription du gène de base, de sa copie additionnelle ou des deux à la fois. On sait que chez les eucaryotes le DNA est associé à des protéines et que ce complexe, ou chromatine, a une conformation différente dans les gènes transcrits et dans ceux qui ne le sont pas : la conformation particulière de la chromatine active rend son DNA plus sensible à l'action de la désoxyribonucléase (DNAase). On peut donc utiliser cette enzyme pour distinguer les deux états des gènes.

Des noyaux ont été isolés de trypanosomes de type antigénique A1 et exposés à de très faibles concentrations de DNAase. Nous avons suivi au cours du temps les progrès de la digestion des DNAs mis en évidence par hybridation avec une sonde spécifique de A1. L'expérience montre très clairement que la copie additionnelle du gène est beaucoup plus sensible à la DNAase que le gène de base et les séquences apparentées. Cette observation peut être considérée comme une démonstration, bien qu'indirecte, de ce que seule la copie additionnelle est transcrite.

Détermination de la séquence d'acides aminés des antigènes de surface.

La structure primaire des antigènes A1, A1b et A8 a été déterminée sur la base des séquences de nucléotides des cDNAs clonés correspondants. On retrouve une homologie partielle entre ces trois séquences indiquant une origine commune. Cette homologie est plus grande dans l'extrémité hydrophobe de l'antigène, constituée d'une trentaine d'acides aminés. Ce travail est effectué en collaboration avec la laboratoire de Biologie générale de la VUB.

Nous poursuivons très activement l'ensemble de ces recherches sur l'organisation et le contrôle de l'expression de ces gènes d'antigènes de surface des trypanosomes. Les gènes eux-mêmes ont été clonés pour en approfondir l'analyse, jusqu'à la séquence complète. Cette analyse porte particulièrement sur les régions qui pourraient être impliquées dans le contrôle de l'expression. Nous cherchons aussi à savoir comment ces gènes évoluent et quelle est l'origine de leur diversité. Pour cela, nous élargissons nos travaux à d'autres souches et espèces de trypanosomes. Ces questions sont d'un intérêt considérable tant en ce qui concerne la connaissance fondamentale que les applications médicales et vétérinaires. On ne peut en effet envisager la réalisation d'un vaccin contre la

maladie du sommeil sans une connaissance plus approfondie des répertoires antigéniques, de leur stabilité et de leur mécanisme d'expression.

RÉFÉRENCES

1. VICKERMAN, K.- (1978). Antigenic variation in trypanosomes, *Nature* 273, 613-617.
 2. CROSS, G. A. M.- (1979), Immunochemical aspects of antigenic variation in trypanosomes. *J. of Gen. Microbiol.* 113, 1-11.
 3. BERNARDS, A.- (1982), Transposable genes for surface glycoproteins in trypanosomes. *Trends in Biochemical Sciences* 7, 253-255.
-

Titre VII
Relations entre la conformation spatiale des immunoglobulines γ et leur interaction avec les chaînes acylées des lipides membranaires

RÉSUMÉ

Une fois réalisée la séquence des acides aminés d'une protéine, le problème se pose des interactions que cette protéine doit présenter avec les membranes lipidiques peri-et endocellulaires pour trouver la place qui lui revient dans la machinerie cellulaire.

Ce problème, dont l'étude vient seulement d'être ébauchée, est envisagé ci-après dans le cas particulier des immunoglobulines. Ces protéines, synthétisées au contact de la face cytoplasmique des membranes endocellulaires, doivent traverser celles-ci complètement si elles sont sécrétées à l'extérieur de la cellule, ou s'y accrocher au passage si elles sont les futurs récepteurs de la membrane externe. Notre hypothèse de travail est que les chaînes polypeptidiques de l'immunoglobuline présentent au cours de leur reploiement une conformation spatiale superficielle hydrophobe assurant leur traversée totale ou partielle des membranes endoplasmiques.

L'une des bases essentielles du développement de l'immunologie au cours des vingt dernières années est sans doute la constatation que les lymphocytes, producteurs chacun d'une immunoglobuline caractérisée par une région variable d'une seule spécificité, portent sur leurs membranes des immunoglobulines récepteurs de même spécificité, pourvues de marqueurs génétiques identiques. Il est apparu, d'autre part, que les immunoglobulines récepteurs sont des protéines de membrane intrinsèques, c'est-à-dire, liées aux chaînes acyle de phospholipides par une liaison hydrophobe alors que les immunoglobulines sécrétées dans le sang sont solubles en milieu aqueux, ne portent apparemment pas de site hydrophobe, et ne peuvent donc pas

présenter de liaisons de ce type avec la membrane. Nous avons donc à comprendre comment une immunoglobuline toujours synthétisée au contact d'une membrane du réseau endoplasmique, peut, soit rester insérée dans la membrane endoplasmique par une liaison hydrophobe et devenir ultérieurement une protéine de la membrane externe, soit passer dans les cisternae du réseau endoplasmique et être sécrétée. Résoudre ce problème exige une étude des interactions possibles d'une immunoglobuline avec des modèles de membranes lipidiques et d'autre part, une étude des interactions des chaînes H et L de l'immunoglobuline naissante avec les membranes endoplasmiques du lymphocyte.

La première partie de ce programme de recherche est la plus avancée, grâce à la collaboration apportée au Laboratoire de Physiologie Animale par des spécialistes de la chimie physique des lipides et de l'étude structurale des protéines (J. M. RUYSCHAERT, M. VANDENBRANDEN, J. L. DE COEN, L. KANAREK).

La seconde partie du programme n'est qu'ébauchée.

INTERACTIONS DES IMMUNOGLOBULINES AVEC DES MEMBRANES LIPIDIQUES ARTIFICIELLES

Une immunoglobuline soluble dans le sang n'établit pas de liaison stable avec les membranes lipidiques artificielles les plus variées. Après un traitement momentané à pH bas et renaturation, apparaît un isomère hydrophobe qui présente une affinité considérable pour les chaînes acyle de lipides variés et provoque ainsi un accroissement de la pression superficielle de monocouches de phospholipides, un accroissement de la conductivité de bicouches planes, une augmentation massive de la densité de liposomes, en particulier, ceux de lipides monoacylés. La structure de cet isomère hydrophobe est extrêmement proche de celle de l'isomère présent dans le sang ainsi qu'en témoignent une quasi identité des spectres de dichroïsme circulaire et une affinité identique pour l'antigène correspondant, si les deux isomères sont de même spécificité.

Le site hydrophobe de l'isomère réactif avec les lipides peut être mis en évidence par la fluorescence caractéristique de l' amino naphthalène sulfonate que cet isomère provoque. Cette fluorescence disparaît si la chaîne H est rompue par un agent protéolytique au niveau de sa région charnière. Simultanément, la réactivité de la molécule avec les chaînes acylées des lipides disparaît. Notre hypothèse de travail est en

conséquence que la région charnière de la chaîne H de l'immunoglobuline peut acquérir une conformation spatiale hydrophobe assurant une liaison locale avec les chaînes acylées des lipides.

La région charnière de la chaîne H de l'immunoglobuline γ est remarquablement riche en acides aminés hydrophobes et peut donc acquérir, sous une conformation spatiale adéquate, la réactivité avec les lipides que nous lui supposons. Elle est d'autre part très riche en prolines et nous devons nous attendre à ce que sa renaturation conduite à des isomères conformationnels, la liaison de chaque proline avec l'acide aminé voisin pouvant présenter l'état cis ou trans dont dépend en partie le mode de replotement d'une chaîne polypeptidique. Ces considérations nous ont amenés à mesurer l'énergie d'activation du passage de l'isomère hydrophobe de l'immunoglobuline γ à l'isomère hydrophile. Cette énergie est raisonnablement proche de celle correspondant à l'isomérisation cis-trans des prolines. Signalons encore que l'isomère hydrophile de l'immunoglobuline γ acquiert tous les caractères de l'isomère hydrophobe s'il est mis au contact direct des chaînes acylées d'un lipide, c'est-à-dire, dans les conditions réalisées dans la partie intermédiaire hydrophobe d'une membrane biologique. Un tel contact a pu être assuré notamment par l'emploi de Sépharose sur lequel de l'acide oléique avait été fixé par une liaison covalente intéressant le seul site hydrophile de la molécule.

Tous ces faits plaident en faveur de l'idée que l'immunoglobuline de membrane et l'immunoglobuline soluble dans le sang diffèrent par leur conformation spatiale et que la réactivité de ces protéines avec une membrane lipidique ne peut résulter uniquement de la séquence de leurs acides aminés.

EFFETS DES IMMUNOGLOBULINES γ SUR LA STABILITÉ D'UNE BICOUCHE LIPIDIQUE

Lorsqu'une cellule étrangère (cellule cible) a fixé les anticorps spécifiques de ses antigènes particuliers, les portions F_c de ces anticorps, entrant en contact avec un lymphocyte y provoquent une réaction cytotoxique qui détruit la cellule cible. La nature de cette action effectrice des portions F_c , simple exemple de beaucoup d'actions effectrices de cette région des immunoglobulines, est inconnue. Nous pensons avoir apporté un fait nouveau qui concerne ce problème. Lorsque des traces d'immunoglobulines sont ajoutées à une suspension

de liposomes d'acide oléique, il suffit d'une molécule de la protéine pour 10^6 molécules d'acide oléique pour provoquer en deux ou trois minutes une fusion des liposomes en structures tubulaires de grandes dimensions. L'élimination des fragments F_c par une action protéolytique convenable diminue 10^4 fois l'action fusogène observée. C'est donc le F_c qui est l'agent actif. La fusion des liposomes entre eux ou avec une membrane cellulaire semble conditionnée par l'apparition au sein de la double couche lipidique de structures hexagonales inversées ou de micelles inversées. Nous proposons donc que l'action fusogène des fragments F_c dépende de l'action déstabilisatrice qu'ils exerceraient sur les doubles couches lipidiques. Une telle action déstabilisatrice expliquerait, au moins partiellement, certaines des actions effectrices des fragments F_c sur les membranes cellulaires. Peut-être pourrions-nous également invoquer un tel mécanisme pour expliquer la traversée de la membrane endoplasmique par des immunoglobulines naissantes.

RECHERCHE SUR L'INTERACTION DES IMMUNOGLOBULINES γ NAISSANTES AVEC LA MEMBRANE ENDOPLASMIQUE

L'étude de l'interaction des immunoglobulines avec des modèles de membrane ne peut être qu'un premier pas dans l'étude de cette interaction avec la membrane endoplasmique, lieu du choix qui doit s'exercer entre immunoglobulines sécrétées et immunoglobulines de membrane. Nous ne pouvons, faute de place, préciser ici la nature de ce problème très complexe. L'hypothèse généralement admise est que la synthèse des chaînes lourdes et légères de l'immunoglobuline sécrétée ou de membrane s'effectue en un temps de l'ordre de la minute, la protéine sécrétée traversant immédiatement la membrane endoplasmique alors que la future protéine de membrane y reste implantée par une liaison hydrophobe. Les deux types de protéines différeraient donc *ab initio* par leur structure et nous devrions rechercher dans les futures immunoglobulines de membrane seulement un site hydrophobe.

Le fait nouveau, apparu au cours de nos recherches, est la présence dans les membranes endoplasmiques de lymphocytes produisant surtout des immunoglobulines sécrétées, d'une très grande abondance d'un polypeptide ayant les caractères sérologiques de la moitié C terminale de la chaîne H et résistant à des actions protéolytiques capables d'éliminer tout le reste de cette chaîne. Ce polypeptide est donc protégé contre de telles actions, c'est-à-dire, lié à la région hydrophobe

de la double couche lipidique membranaire. Sa grande abondance est incompatible avec l'idée qu'il s'agit d'une partie des chaînes H, précurseurs des immunoglobulines de membrane, très rares dans les cellules au repos étudiées. La persistance de ce polypeptide dans la membrane pendant environ une heure, c'est-à-dire, jusqu'au moment de la libération dans le milieu extérieur des immunoglobulines sécrétées, nous fait penser que ces dernières, loin d'être libérées immédiatement après leur synthèse, comme on l'admet généralement, restent pendant une heure approximativement des protéines de membrane. Les immunoglobulines γ sécrétées doivent donc être des protéines de membrane dans une première phase de leur évolution et posséder une structure hydrophobe. Cette structure hydrophobe, d'origine conformationnelle dans notre hypothèse de travail, perdrait par isomérisation son hydrophobicité au moment de la sécrétion dans le sang. Elle pourrait être la région charnière de la chaîne H dont l'hydrophobicité conformationnelle a été étudiée dans la première partie de notre travail.

APPLICATIONS TECHNOLOGIQUES POSSIBLES DE NOS RÉSULTATS

La fixation d'un isomère hydrophobe d'anticorps sur des liposomes vecteurs d'agents pharmacologiques pourrait assurer la fixation de ces liposomes sur des cellules cibles spécifiques. La fusion de ces liposomes avec la membrane des cellules cibles devrait être provoquée par une protéine destabilisatrice de la double couche lipidique, par exemple, la fraction F_c d'une immunoglobuline.

RÉFÉRENCE

SABATINI, KREIBICH, MORIMOTO, ADESNIK.— «Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles», *Journal of Cell Biology*, 1982, 92, 1-22.

Jacques Urbain

Titre VIII

Le système immunitaire, la diversité des anticorps et le réseau idiotypique

avec la collaboration de

Catherine BRUYNS, Claudine COLLIGNON, Donat DE GROOTE, Cécile DEMEUR, Myriam FRANCOTTE, Jean-Denis FRANSEN, Oberdan LEO, Bernard MARIAME, Jacqueline MARVEL, Patricia MEYERS, Muriel MOSER, Moncif SLAOU, Anne-Françoise TILKIN, Anne-Marie VAN ACKER, Philippe VAN DE WALLE, Georgette VANSANTEN, Maurice WIKLER et Christian WUILMART

RÉSUMÉ

L'immunologie est confrontée à deux grands problèmes : l'origine de l'effarante diversité des anticorps et la régulation de la réponse immunitaire. L'explosion des méthodes d'isolement et de dissection des gènes a permis l'analyse directe de l'origine de la diversité des anticorps. La reconnaissance du système immunitaire comme un réseau complexe permet d'imaginer les mécanismes de son contrôle. La reconnaissance du soi devient une des pierres angulaires du système immunitaire.

Thomas Kuhn décrit l'évolution d'une science comme une suite de paradigmes se succédant les uns aux autres. Un paradigme est constitué par l'ensemble des idées acceptées à un moment donné par la plupart des scientifiques d'une discipline. Ces idées guident les expériences et définissent le cadre de leur interprétation. Le progrès scientifique correspond généralement au remplacement du paradigme par un autre. Très souvent, le nouveau paradigme ne détruit pas entièrement les idées acceptées d'hier mais les éclaire d'une nouvelle lueur et les incorpore dans un cadre intellectuel plus large.

Il semble que l'on assiste actuellement en immunologie à des modifications profondes de la compréhension du système immunitaire.

Le but de cet article est de donner un bref aperçu de la mutation qui affecte l'immunologie et qui paraît correspondre à un changement de paradigme, changement qui pourrait se résumer brièvement par quelques mots : de la sélection clonale au réseau immunitaire.

L'EFFARANTE DIVERSITÉ DES ANTICORPS

Les immunologistes sont confrontés à deux problèmes majeurs : l'origine de la diversité des anticorps et les mécanismes de régulation opérant au sein du système immunitaire. Le système immunitaire est caractérisé par une série de propriétés fascinantes, dont la compréhension est encore loin d'être acquise. Parmi toutes ces propriétés, la plus évidente, la plus immédiate et peut-être la plus déroutante est l'énorme diversité du répertoire immunitaire. Dans des conditions appropriées, l'injection dans un animal de n'importe quelle protéine, n'importe quel polysaccharide, n'importe quel acide nucléique, lipide ... entraîne la formation d'anticorps spécifiques. Il existe de plus un mécanisme d'autocensure ou de tolérance naturelle, empêchant l'apparition d'autoanticorps.

L'extraordinaire diversité du répertoire des anticorps suscite un grand nombre de questions. Existe-t-il autant de gènes différents qu'il y a d'anticorps ? Ces gènes sont-ils tous présents dans les cellules germinales et transmis à la descendance ou y-a-t-il variations somatiques de ces gènes pendant la vie d'un individu ? Quelles sont les forces sélectives capables de maintenir un tel répertoire ? En effet, s'il est aisé d'accepter qu'un lapin ou une souris synthétisent des anticorps spécifiques le protégeant contre des agents pathogènes, continuellement présents dans sa niche écologique, il est plus difficile de concevoir l'existence d'une réponse immunitaire spécifique de l'albumine de crocodile ou de koala, de cellules d'éponges, d'une carboxylase d'épinard. Le système immunitaire est capable de répondre, de s'adapter à l'imprévisible et constitue un paradoxe pour la sagesse populaire du darwinisme classique. Le paradoxe est encore plus aigu si l'on considère le phénomène de l'idiotypie, découvert par Jacques Oudin, Henry Kunkel et A. Kelus. Nous utiliserons une comparaison pour expliquer au lecteur non immunologiste le phénomène de l'idiotypie.

Si nous isolons, à partir du sérum de 50 souris ou de 50 lapins les chaînes α de l'hémoglobine adulte et si nous déterminons la séquence

d'acides aminés, la même séquence apparaît chez tous les individus d'une même espèce. Si par contre, nous immunisons 50 lapins avec le même antigène (Salmonella, par exemple), chaque animal va répondre par la synthèse d'anticorps spécifiques de la bactérie mais les anticorps synthétisés dans un animal seront différents des anticorps synthétisés par un autre animal. Les anticorps anti-Salmonella sont spécifiques de l'antigène et de l'individu. Si les anticorps anti-Salmonelle du lapin numéro 1 sont injectés au lapin numéro 2, ce dernier va reconnaître les anticorps du premier lapin comme étrangers et va synthétiser des anticorps de deuxième génération, spécifiques des anticorps du premier lapin. Les anticorps du premier lapin sont appelés idiotypes et les anti-anticorps sont appelés anticorps anti-idiotypiques. Les anticorps anti-idiotypiques du lapin numéro 2 reconnaissent les idiotypes du lapin numéro 1, mais, en règle générale, ils ne reconnaissent pas les anticorps anti-Salmonella du lapin 3, 4, 5 ... Chaque animal utilise donc un répertoire individuel beaucoup plus restreint que le répertoire de l'espèce. En plus, très souvent, parents et enfants utilisent également des répertoires idiotypiques différents.

Si nous prenons un sérum anti-idiotypique donné, dirigé par exemple contre un anticorps anti-virus de la mosaïque du tabac, seuls les sérums de 3 ou 4 lapins sur 100, donneront une réaction avec le sérum anti-idiotypique. De nombreuses expériences indiquent qu'il y a un chevauchement entre les motifs antigéniques (spécificités idiotypiques) reconnus par les anticorps anti-idiotypiques et le site actif de l'idiotype. On se souviendra que le site actif d'une immunoglobuline est formé par l'association de zones hypervariables des parties variables des chaînes d'immunoglobulines. Le chevauchement n'est pas total. Oudin et Cazenave ont montré dès 1971 que des motifs idiotypiques similaires peuvent être trouvés dans le sérum d'un individu sur des anticorps et sur des immunoglobulines sans fonction anticorps. Cette découverte a joué un rôle important dans le développement du concept de réseau idiotypique. Si les individus différents d'une même espèce exploitent des «solutions» différentes pour répondre au même antigène, les anticorps anti-idiotypiques peuvent à leur tour devenir antigènes et induire la formation d'anticorps de troisième génération (anticorps anti-anti-idiotypiques), qui à leur tour peuvent susciter l'induction d'anticorps de quatrième génération (anti-anti-anti-idiotypiques) ...

A première vue, ces faits intrigants semblent peu compatibles avec les données classiques de la génétique et donnent l'idée d'une diversité

infinie et folle. Toute règle a ses exceptions, y compris l'idiotypie. Dans certains cas, particulièrement chez des souris de race pure, l'injection d'un antigène induit la synthèse d'anticorps idiotypiquement très semblables d'un individu à l'autre. Ces exceptions sont appelées idiotypes majeurs, publics ou récurrents. Mais il faut souligner que le nombre d'idiotypes récurrents est beaucoup plus petit que le nombre d'«idiotypes à la Oudin» (idiotypes spécifiques d'un antigène et d'un individu).

UNE SÉLECTION DARWINIENNE DES LYMPHOCYTES B

La spécificité des réponses immunitaires peut être expliquée par un choix sélectif, opéré par l'antigène, au milieu d'innombrables clones de lymphocytes unispécifiques. Il est admis par beaucoup d'immunologistes que les mécanismes de régulation des lymphocytes B, qui sont les précurseurs des cellules productrices d'anticorps conduisent à l'expression dans chaque lymphocyte d'un seul type moléculaire d'immunoglobuline de membrane (en fait beaucoup de lymphocytes expriment plusieurs classes d'Ig sur leur membrane, mais les parties variables sont identiques). L'énorme répertoire d'un individu correspond à la présence d'une librairie de clones, prédéterminés avant l'arrivée de l'Ag à la synthèse d'Ig. Lorsque l'antigène arrive, il se combine aux récepteurs membranaires possédant une affinité suffisante. Cette interaction intervient dans le déclenchement de la prolifération et de la différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps identiques dans leur partie variable à ceux qui étaient présents sur la membrane avant l'arrivée de l'antigène.

Ce scénario de sélection darwinienne explique aisément la spécificité de la réponse, la mémoire immunitaire et le phénomène d'apprentissage (accroissement au cours du temps de l'affinité des anticorps pour l'antigène). En effet, lors d'un second contact avec l'antigène, en raison de la multiplication cellulaire intervenue pendant la réponse primaire, le nombre de lymphocytes de la «bonne spécificité» sera plus élevé que lors du premier contact. La réponse immunitaire sera dès lors plus massive et plus rapide. Lorsque la concentration de l'antigène va décroître au cours de la réponse immunitaire, les clones possédant des antennes récepteurs de plus haute affinité auront un avantage sélectif sur les clones «de faible affinité» et seront préférentiellement stimulés. Cette compétition conduira à un accroissement de l'affinité moyenne

des anticorps. Ce schéma, théorie de la sélection clonale, a la faveur de nombreux immunologistes et est considéré comme étant démontré expérimentalement. On pourrait toutefois se demander si la puissance explicative de ce schéma simple, élégant et rigoureusement darwinien n'est pas le principal motif d'acceptation du paradigme, plus que les données expérimentales. Le débat est d'ailleurs loin d'être clos.

LA THÉORIE DES MUTATIONS SOMATIQUES ET LA DESTRUCTION DES «CLONES INTERDITS»

Si nous associons à ce schéma un mécanisme de l'origine de la diversité des anticorps, basé sur des mutations somatiques et un mécanisme de tolérance naturelle, nous arrivons à une vision globale et cohérente du système immunitaire. Cette conception globale est une description fidèle de ce que pensaient de nombreux immunologistes, il y a dix ans et permettra une meilleure compréhension des nouveaux concepts, plus sophistiqués du réseau immunitaire. Comme le système immunitaire est capable de s'adapter magiquement à l'imprévisible, beaucoup ont pensé qu'il était impossible que le répertoire total soit inscrit dans l'ADN des cellules germinales. Le répertoire initial germinatif serait constitué d'un petit nombre de gènes (V_0).

Au cours de la multiplication et de la différenciation des lymphocytes à partir de cellules souches de la moëlle, des mutations somatiques s'accumuleraient dans ces gènes germinatifs, créant l'énorme diversité du répertoire adulte. Cette idée expliquerait simplement le phénomène de l'idiotypie, puisque des mutations somatiques différentes interviendraient dans les gènes d'immunoglobulines de différents individus. Puisque le répertoire immunitaire est construit de novo dans chaque individu, les enfants auront un répertoire différent de celui des parents. Dans l'énorme répertoire provenant de l'accumulation de mutations somatiques, apparaîtront inévitablement des anticorps capables de reconnaître des antigènes du soi, synthétisés par le même individu. La seule différence qui distingue les antigènes du soi des antigènes extérieurs est la présence continuelle des antigènes du soi. Par conséquent, si l'on admet que tout lymphocyte passe par un stade de différenciation où toute rencontre antigénique l'inactive, les seuls lymphocytes qui émergeront et constitueront le répertoire adulte, inductible par des antigènes seront ceux capables uniquement de reconnaître des antigènes qui ne sont pas présents pendant la phase

critique du développement du système immunitaire. L'hypothèse que nous venons de décrire (sélection clonale, mutations somatiques) est restée pendant de nombreuses années le paradigme de nombreux immunologistes. Cette hypothèse a l'élégance de la simplicité, possède une grande séduction logique, est une extension du scénario darwinien au niveau lymphocytaire et rend compte d'un nombre impressionnant de données expérimentales, que nous ne pouvons détailler ici.

Cependant depuis plusieurs années, l'immunologie vit une révolution conceptuelle et technologique. Un foisonnement de découvertes est venu obscurcir la clarté et la logique du paradigme perdu.

Essentiellement, si nous comparons l'immunologie de 1980 avec l'immunologie de 1970, plusieurs groupes de données ont émergé.

- L'explosion des méthodes d'isolement et de dissection des gènes (génie génétique) a permis une analyse directe des gènes d'immunoglobulines et des problèmes de l'origine de la diversité des anticorps.
- La découverte de l'existence de compartiments lymphocytaires à fonctions différentes et interconnectés a provoqué l'abandon de l'approche réductionniste du système immunitaire.
- L'établissement de la reconnaissance restrictive des lymphocytes T a jeté une nouvelle lumière sur les rapports qui existent entre le locus majeur d'histocompatibilité et le système immunitaire.
- La reconnaissance du système immunitaire comme un réseau idiotypique a bouleversé la compréhension des mécanismes de régulation du système immunitaire.

Ces deux derniers faits impliquent l'émergence d'un nouveau paradigme : l'autoréactivité (ou la reconnaissance du soi) est une des pierres angulaires du fonctionnement du système immunitaire. Cette autoréactivité concerne à la fois les antigènes majeurs d'histocompatibilité et les motifs idiotypiques. Ceci signifie concrètement que dans le fonctionnement normal d'une réponse immunitaire interviennent des structures de reconnaissance anti-H2 et anti-idiotypiques, alors que les anciennes théories admettaient que les phénomènes d'autoréactivité existaient comme exceptions et dérèglements du système immunitaire, conduisant à des conséquences pathologiques (maladies d'autoimmunité).

Nous décrirons d'abord brièvement l'existence des compartiments et la reconnaissance restrictive avant d'analyser les apports des travaux du génie génétique et l'hypothèse du réseau idiotypique.

LES COMPARTIMENTS LYMPHOCYTAIRES

En fait, l'univers des lymphocytes contient deux groupes fondamentalement différents : les lymphocytes B et T. Les lymphocytes B sont les précurseurs des cellules productrices d'anticorps. Ils possèdent sur leur membrane des récepteurs immunologiques, dont les parties variables au moins sont identiques à celles des immunoglobulines, sécrétées après activation appropriée. Dans la plupart des cas, l'antigène seul est incapable de provoquer la différenciation d'un lymphocyte B en plasmacyte. Cette différenciation requiert l'assistance d'un lymphocyte T dit «helper». Les lymphocytes T proviennent des mêmes cellules souches médullaires que les lymphocytes B, mais subissent une période «d'écolage» critique dans le thymus. Leurs récepteurs immunologiques ne sont pas des immunoglobulines conventionnelles mais contiennent vraisemblablement un morceau de la partie variable des chaînes lourdes d'immunoglobulines, associé à une partie constante caractéristique des lymphocytes T. Ils sont responsables, non seulement de l'immunité cellulaire (rejet des greffes, hypersensibilité différée, lyse de cellules infectées par des virus ou bactéries intracellulaires ...), mais également et surtout, du contrôle de l'activation des lymphocytes B. Le lymphocyte T a été décrit comme le chef de l'orchestre immunologique. Il existe plusieurs compartiments de lymphocytes T, associés à des fonctions différentes. Une catégorie est le lymphocyte T helper programmé pour donner des signaux positifs de différenciation aux lymphocytes B. Une autre catégorie de lymphocytes, les lymphocytes T inhibiteurs, ont une fonction antagoniste. Ils sont capables de bloquer la fonction des lymphocytes T helper ou la synthèse des immunoglobulines par les lymphocytes B.

Lors de l'intrusion d'un antigène, le système immunitaire répond d'abord par la prolifération et l'activation des lymphocytes T helper. Ces derniers «assistent» les lymphocytes B qui se transforment en cellules sécrétrices d'anticorps. Une sous-population de lymphocytes T helper induit l'activation de la population antagoniste, les lymphocytes T inhibiteurs, qui inhibent la fonction des lymphocytes T helper et par conséquent, la différenciation des lymphocytes B. L'activation des lymphocytes T suppresseurs peut donc être considérée comme l'enclenchement d'un circuit rétroinhibiteur. Ce circuit rétroinhibiteur est particulièrement bien illustré par le phénomène de la barrière isogénique. Les lymphocytes B de mémoire d'une souris immunisée

sont rendus silencieux lorsqu'ils sont transférés dans un animal receveur génétiquement identique au donneur. Cette paralysie fonctionnelle n'apparaît pas lorsque les mêmes lymphocytes de mémoire sont greffés à des souris «nues» (dépourvues de thymus) où à des souris irradiées à faible dose. On peut démontrer que les lymphocytes de mémoire déclenchent chez l'animal receveur l'induction de lymphocytes T inhibiteurs. Les lymphocytes T inhibiteurs possèdent des récepteurs membranaires pour l'histamine et leur enlèvement permet d'accroître considérablement l'intensité d'une réponse immunitaire. Le schéma décrit ci-dessus est sans doute trop simple, de nouvelles sous-populations de lymphocytes T (notamment des lymphocytes T contrasuppresseurs) ayant été décrites récemment.

LA RECONNAISSANCE RESTRICTIVE

Une caractéristique essentielle de la plupart des lymphocytes thymiques est l'utilisation d'un double système de reconnaissance, mis en jeu dans leurs interactions avec d'autres cellules. Les lymphocytes T ne sont activés par un antigène que si cet antigène est associé à une membrane exhibant des antigènes de surface adéquats. Ils sont équipés d'un récepteur immunologique (V anti-X) dont il a été fait mention plus haut et d'un récepteur physiologique (R anti-H) spécifique de protéines du soi, codées dans le locus majeur d'histocompatibilité. Les deux types de récepteurs sont fonctionnellement liés. Les récepteurs physiologiques de compartiments lymphocytaires différents ont des spécificités différentes : le lymphocyte T cytotoxique est activable par un antigène associé aux antigènes d'histocompatibilité H2K ou H2D (protéines présentes sur tous les types cellulaires d'un organisme) tandis que le lymphocyte T helper est induit par un antigène associé aux marqueurs de surface codés par le locus I (situé entre les loci H2K et H2D, chez la souris), présents seulement sur la membrane de quelques types cellulaires (lymphocytes B, monocytes, cellules dendritiques ...). Si l'on se souvient que les antigènes d'histocompatibilité sont extraordinairement polymorphes et constituent pratiquement une carte d'identité individuelle, on constate que le lymphocyte T reconnaît un antigène uniquement si celui-ci est présenté en conjonction avec un «marqueur du soi». Cette reconnaissance n'est pas dictée rigidement par le génotype mais est acquise pendant l'ontogénèse du système immunitaire. Ainsi, l'autoréactivité vis-à-vis des antigènes d'histocompatibilité

est une partie intégrale du processus d'interactions cellulaires impliqué dans le contrôle de la réponse immunitaire.

INTRODUCTION AUX CONCEPTS DU RÉSEAU

Considérons l'ensemble des immunoglobulines qu'un animal est capable de synthétiser.

A première vue, nous avons deux groupes d'Ig : le groupe I comprend tous les anticorps conventionnels dirigés contre les antigènes extérieurs (bactéries, virus ...), le groupe II contient tous les anticorps spécifiques d'anticorps (anticorps anti-idiotypiques). Une question vient immédiatement à l'esprit : est-il raisonnable de penser que les groupes I et II sont des ensembles indépendants ? Etant donné le dualisme d'une molécule d'Ig (1 molécule peut reconnaître un antigène extérieur et peut devenir un antigène induisant la synthèse d'anticorps de deuxième génération) et le fait que chaque animal peut synthétiser des anticorps de deuxième génération, de troisième génération, de quatrième génération, il apparaît que les deux groupes forment un seul et même ensemble. L'équivalence des deux ensembles implique l'hypothèse du réseau idiotypique. En d'autres termes, le système étant complet (capable de reconnaître n'importe quel antigène), il ne peut éviter de reconnaître ses propres éléments. La base cruciale de l'hypothèse du réseau est la coexistence dans le répertoire d'un individu à la fois d'idiotypes et d'anti-idiotypes. Cette coexistence permet d'imaginer un nouveau mode de communication entre lymphocytes, mode utilisant directement les parties variables d'immunoglobulines. Un lymphocyte porteur de récepteurs d'une spécificité donnée peut interagir avec un autre lymphocyte porteur de récepteurs complémentaires (réseau formel). L'hypothèse du réseau n'est pas seulement une nouvelle manière abstraite et sophistiquée de décrire l'énorme diversité du répertoire (le nombre d'immunoglobulines dans un individu est tel qu'on trouvera toujours deux immunoglobulines capables de se reconnaître spécifiquement) mais suppose que ces interactions idio-antidiotype ont un sens fonctionnel, sont impliquées dans les circuits de régulation du système immunitaire. D'une manière plus concrète, on pourrait exprimer l'idée de base de l'hypothèse du réseau en disant que toute réponse immunitaire dirigée contre un antigène enclenche une deuxième réponse immunitaire, dirigée spécifiquement contre la première et modulant la grandeur et l'intensité de la première réponse.

Notons que ce schéma n'implique pas nécessairement des anticorps de deuxième génération. L'essentiel de cette régulation pourrait concerner les récepteurs de membrane des lymphocytes T.

Une autre conséquence de l'hypothèse du réseau est la notion d'«image interne». L'injection d'un antigène déclenche la synthèse d'anticorps de première génération, spécifiques de l'antigène et de l'individu (idiotypes). A leur tour, ces anticorps deviennent antigènes et provoquent l'apparition d'anticorps antiidiotypiques. Les idiotypes sont donc à la fois reconnus par l'antigène et par les anticorps de deuxième génération. Il est probable que certains anticorps antiidiotypiques «voient» le site actif de l'anticorps de la même manière que l'antigène. Une partie des anticorps antiidiotypiques se comporte comme une «image interne» de l'antigène. En d'autres termes, la diversité des déterminants idiotypiques est telle qu'à chaque déterminant antigénique correspondra une image interne (molecular mimicry). De telles images internes ont été caractérisées expérimentalement, notamment dans le cas du virus de la mosaïque du tabac.

Nous sommes venus à l'idée du réseau idiotypique dans notre laboratoire en considérant les problèmes d'évolution des immunoglobulines et sur la base d'expériences difficilement interprétables dans le cadre de l'hypothèse de la sélection clonale.

Ainsi que nous l'avons exposé plus haut, la difficulté principale des théories germinatives de l'origine de la diversité des immunoglobulines est le problème de la sélection et de la conservation d'un grand nombre de gènes d'immunoglobulines dont beaucoup, apparemment, ne seront pas utilisés pendant la vie de l'animal ? La pression sélective externe due aux antigènes est insuffisante pour expliquer le maintien de gènes codant pour des anticorps spécifiques de l'albumine de crocodile ou d'une molécule qui vient d'être synthétisée en laboratoire ... La sélection naturelle ne peut être basée que sur une expérience passée et la réponse du système immunitaire à l'imprévisible ne peut être expliquée sur la base d'une pression sélective externe.

L'existence d'un réseau idiotypique permettrait de concevoir une pression sélective interne, assurant la conservation d'un vaste répertoire germinatif. En effet, si toute immunoglobuline est anti-idiotypique d'une autre dans le répertoire d'un individu et si les interactions qui en résultent sont fonctionnelles, le maintien d'un grand nombre de gènes d'immunoglobulines pourra être assuré dans l'évolution des espèces. Au delà des postulats de base qui reflètent les préjugés de chacun, la

question essentielle est de savoir si le système immunitaire est un réseau idiotypique fonctionnel, si une partie de la régulation de la réponse immunitaire est assurée par des signaux qui sont engendrés dans l'intérieur du système lui-même ?

Au début de nos recherches, nous avons repris l'étude du phénomène d'apprentissage (accroissement de l'affinité des anticorps au cours du temps qui s'écoule après immunisation). Grâce à l'utilisation d'une méthode d'analyse qui permettait de mesurer l'affinité des anticorps sans les isolés, nous avons pu étudier la dynamique d'une réponse immunitaire de lapins immunisés contre le virus de la mosaïque du tabac. Les premiers travaux confirment immédiatement les résultats obtenus par Jerne, Eisen, Siskind, montrant une montée progressive de l'affinité au cours du temps. A notre grande surprise, cette montée d'affinité était suivie d'une décroissance à la fin d'une réponse primaire, secondaire, tertiaire ... Cette descente d'affinité n'affectait en rien le potentiel de mémoire immunitaire. Après la phase de décroissance, la simple réinjection d'antigène provoquait l'apparition rapide d'anticorps de haute affinité. Si la montée d'affinité était bien expliquée par le scénario de la théorie clonale, la descente d'affinité ne pouvait en être déduite. Cette descente d'affinité ne pourrait être due qu'à l'inactivation temporaire et réversible des cellules de mémoire caractérisées par des récepteurs de haute affinité et devait donc résulter d'un mécanisme de rétroaction, capable de distinguer les sites actifs des anticorps de haute et faible affinité. Deux catégories de molécules, seulement, sont capables d'une telle discrimination, les antigènes et les anticorps anti-idiotypiques (anticorps de deuxième génération spécifiques des anticorps de première génération). A l'époque, aucune des deux hypothèses ne paraissait plausible. De faibles concentrations d'antigène auraient dû continuer à sélectionner les clones de haute affinité. La deuxième hypothèse, en contradiction flagrante avec la tolérance naturelle, impliquait l'existence d'une réaction immunitaire de second ordre, dirigée contre la première. L'article fut publié dans un scepticisme général en indiquant qu'une réponse immunitaire devait résulter non pas seulement d'une sélection par l'antigène de clones indépendants mais d'interactions interlymphocytaires. Simultanément et indépendamment, le groupe de G. Doria rapportait des faits expérimentaux identiques dans un autre système. A la même époque, fut annoncée la découverte par Claman, Miller ... que l'univers des lymphocytes comprenait deux mondes, les lymphocytes T et les

lymphocytes B, dont l'interaction était indispensable pour le succès d'une réponse immunitaire. Nous avons dès lors tenté des expériences de mise en évidence plus directe d'interactions lymphocytaires en utilisant le schéma expérimental suivant : des lapins irradiés furent repeuplés avec des lymphocytes provenant de lapins hyperimmunisés. Les lapins repeuplés étaient ensuite injectés avec l'antigène. Dans ce schéma expérimental se trouvent en contact les lymphocytes de l'animal donneur et les lymphocytes immatures de l'animal receveur, qui apparaissent pendant la phase de restauration, après irradiation. L'analyse du système révélait que les anticorps étaient synthétisés par des cellules de l'animal receveur fournissant les cellules immatures. Néanmoins, il y avait une influence spécifique des lymphocytes de mémoires du donneur car les anticorps synthétisés étaient d'emblée de haute affinité et porteurs de motifs idiotypiques similaires à ceux trouvés sur les anticorps de l'animal donneur de cellules de mémoires. Ainsi l'expérience suggérait l'existence de mécanismes d'interactions tels que des lymphocytes de mémoire puissent «obliger» d'autres lymphocytes immatures à produire des anticorps très similaires à ceux exprimés sur la membrane des cellules de mémoires. A priori, deux types de mécanismes pouvaient être envisagés pour expliquer les résultats :

- a) un transfert d'information des lymphocytes de mémoire vers les lymphocytes immatures.
- b) une sélection par les lymphocytes de mémoire des clones de lymphocytes immatures, programmés pour la synthèse d'anticorps idiotypiquement similaires à ceux des lymphocytes de mémoire. Cette deuxième hypothèse impliquait des interactions idiotype-antiidiotype comme langage de communication entre lymphocytes et rejoignait l'hypothèse de Jerne et de Lindenmann.

A première vue, l'hypothèse du réseau idiotypique se heurte à de nombreuses difficultés. L'injection des mêmes anticorps antiidiotypiques peut, soit favoriser, soit diminuer l'expression des idiotypes complémentaires. Il semble difficile à première vue de comprendre comment la même réaction idiotype-antiidiotype peut tantôt avoir des effets positifs, tantôt des effets négatifs. A cet égard, il est clair que l'hypothèse du réseau dans sa formulation initiale est trop floue, trop imprécise et n'a pas une valeur prédictive. La seconde objection concerne la notion d'image interne. Il paraît difficile de concevoir des immunoglobulines possédant dans leurs parties variables des structures

antigéniques imitant des épitopes aussi dissemblables que ceux appartenant à des polysaccharides, des acides nucléiques, des haptènes. L'exemple de la morphine et des endorphines indique cependant que des structures aussi différentes que des alcaloïdes et des polypeptides peuvent se combiner aux mêmes récepteurs de membrane. Une troisième objection semble plus fondamentale. Si une réponse immunitaire caractérisée par un ensemble d'idiotypes donnés suscite une réponse de second ordre, spécifique de la première, la deuxième réponse pourrait provoquer une troisième qui elle-même entraînerait une quatrième.

Toute réponse immunitaire se propagerait ainsi par vagues successives, envahissant progressivement tout le système immunitaire. A cause de la dégénérescence d'une réponse immune, une telle cascade entraînerait une perte de la spécificité immunologique et aboutirait à une absurdité physiologique. Nous verrons plus loin que les faits expérimentaux lèvent cette objection.

L'hypothèse du réseau a suscité de nombreuses réflexions et expériences stimulantes. A ce titre, l'hypothèse aura joué un rôle important dans le développement de l'immunologie. L'accumulation sans cesse croissante de faits expérimentaux indique que les éléments de base de l'hypothèse sont corrects.

Il y a effectivement coexistence au sein du répertoire d'un même individu de récepteurs idiotypiques et anti-idiotypiques et les interactions qui en résultent sont impliquées dans les communications interlymphocytaires et dans les circuits de régulation contrôlant l'intensité et la durée d'une réponse immunitaire.

LA COËXISTENCE D'IDIOTYPES ET D'ANTIIDIOTYPES DANS LE RÉPERTOIRE D'UN MÊME INDIVIDU

Si un lapin est immunisé avec un antigène A, il répond par la synthèse spécifique d'anticorps anti-A. Si l'on isole les anticorps anti-A et si on les réinjecte après un certain temps dans le lapin qui les a préalablement synthétisés, il apparaît dans le sérum du lapin des anticorps de deuxième génération ou anticorps autoantidiotypiques, spécifiques des anticorps de première génération. Ces anticorps autoantidiotypiques ne reconnaissent pas les anticorps d'autres lapins, immunisés avec le même antigène. Ainsi, le système immunitaire d'un animal est capable de reconnaître spécifiquement ses propres éléments.

De tels anticorps autoanti-idiotypiques apparaissent «spontanément» au cours de nombreuses réponses immunitaires, sans réinjection «artificielle» des anticorps mélangés à des adjuvants.

MANIPULATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

Si une balance entre récepteurs idiotypiques et anti-idiotypiques joue un rôle dans les mécanismes de contrôle d'une réponse immunitaire, il doit être possible de modifier cette réponse (de l'augmenter ou de la diminuer) en perturbant spécifiquement cette balance. Les premières indications sont venues des groupes de K. Eichmann et K. Rajewsky. Ces auteurs ont montré que le prétraitement de souris avec des anticorps anti-idiotypiques, spécifiquement dirigés contre un idiotype récurrent, permettait d'augmenter fortement ou de supprimer l'expression de l'idiotype correspondant, lorsque l'antigène est injecté un certain temps après les anticorps anti-idiotypiques. Toutes ces expériences ont utilisé des idiotypes récurrents, qui apparaissent dans tous les individus d'une espèce injectés avec le même antigène. Qu'en est-il des idiotypes «à la Oudin», spécifiques d'un antigène et d'un individu ? Pendant longtemps, le phénomène de l'idiotypie a été expliqué par «un jeu de hasard», des mutations somatiques différentes s'accumulant dans un petit nombre de gènes germinatifs provoquaient l'apparition de répertoires immunitaires propres à chaque individu.

Une autre explication est toutefois possible. L'expression d'idiotypes différents chez des individus différents pourrait résulter, non pas de potentialités génétiques différentes, mais de l'expression différentielle d'un même répertoire de base. Cette expression différentielle pourrait être due à des mécanismes complexes d'activation ou de suppression impliquant des circuits idiotypiques. Dans ce cas, il devrait être possible de «reprogrammer» le système immunitaire et de le contraindre à exprimer des idiotypes «silencieux». Choisissons deux lapins au hasard, x et y, sans relations parentales. Nous savons que les deux lapins injectés avec un même antigène synthétisent des idiotypes différents. Supposons que le lapin x possède néanmoins dans son répertoire des clones lymphocytaires silencieux, potentiellement capables de synthétiser l'idiotype y. Une raison possible du silence de ces lymphocytes dans le lapin x pourrait être la présence de lymphocytes (T ?) inhibiteurs, dont les récepteurs reconnaîtraient spécifiquement l'idiotype y.

L'induction d'une immunité spécifique des récepteurs antiidiotypiques des lymphocytes inhibiteurs (en fait une réponse antiantiidiotypique, constituée d'anticorps de troisième génération) devrait permettre une levée de la suppression et l'expression de l'idiotype y dans le lapin x . Ce raisonnement a conduit notre laboratoire à Rhode-St-Genèse et celui de P. A. Cazenave, à l'Institut Pasteur, à des expériences d'immunisation en cascade, démontrant qu'on pouvait apprendre à un animal à synthétiser l'anticorps d'un autre animal. Ces expériences qui ont été faites simultanément, indépendamment, ont conduit aux mêmes résultats expérimentaux. Ces résultats viennent d'être confirmés par le laboratoire de W. Paul (au N.I.H. Washington). Un anticorps de première génération (anti-Microcoque, anti-TMV, anti-RNase) est injecté dans des conditions appropriées à des lapins de manière à susciter des anticorps antiidiotypiques ou anticorps de deuxième génération. Ces anticorps de deuxième génération sont injectés à une troisième série de lapins qui répondent par la synthèse spécifique d'anticorps de troisième génération (anti-antiidiotypiques). Quand les lapins de la troisième série sont immunisés avec l'antigène qui a servi à induire les anticorps de première génération, ils répondent par la synthèse d'anticorps spécifiques de l'antigène mais cette fois idiotypiquement très semblables à ceux de la première génération. En d'autres termes, les lapins de la troisième série ont appris à synthétiser l'idiotype de départ. Ces résultats démontrent que le répertoire total est pratiquement équivalent chez tous les lapins et que des mécanismes inhibiteurs, à nature idiotypique, sont responsables de l'expression des répertoires individuels. Chaque animal exprime seulement une petite partie de son répertoire total et le phénomène de l'idiotypie ne peut être simplement expliqué par un processus de mutations somatiques.

Il est intéressant de noter que nous avons réussi à obtenir des anticorps de quatrième génération. Une partie des anticorps de quatrième génération reconnaît directement les anticorps de première génération. Ainsi, si l'on considère l'idiotypie des anticorps induits en cascade, les anticorps de quatrième génération sont très similaires à ceux de deuxième génération, tandis que les anticorps de troisième génération sont semblables à ceux de première génération. Ces faits indiquent qu'il n'est pas nécessaire de concevoir des réseaux linéaires $Ab_1 \rightarrow Ab_2 \rightarrow Ab_3 \rightarrow Ab_4 \dots Ab_1$ où l'hétérogénéité croît à chaque étape mais que le premier niveau d'interactions $Ab_1 \rightarrow Ab_2$ suffit pour la régulation. Une des objections majeures à l'hypothèse du réseau est

ainsi levée. Des résultats similaires ont été maintenant établis dans 7 systèmes antigéniques différents et dans deux espèces. Des travaux effectués chez les lignées syngéniques de souris ont permis d'analyser les mécanismes cellulaires impliqués dans les expériences d'obtention des idiotypes à la carte. Il a été clairement montré que l'absence d'expression d'un idiotype donné dans une lignée de souris est liée à la présence de lymphocytes T suppresseurs dont les récepteurs immunologiques reconnaissent spécifiquement l'idiotype silencieux. L'induction chez de telles souris, d'anticorps de troisième génération, bloque l'activité de ces cellules T inhibitrices, comme nous l'avions supposé dans notre hypothèse de travail.

De plus, nous avons récemment montré que l'apprentissage de l'expression d'un idiotype donné peut être transmis à leur descendance par des lapines synthétisant des anticorps de troisième génération. Cette transmission d'un caractère acquis se fait vraisemblablement par le passage des immunoglobulines maternelles qui sont en contact avec le système immunitaire immature des foetus. L'ensemble de ces résultats peut être résumé de la manière suivante :

- a) le répertoire immunitaire *total* est très semblable chez tous les individus d'une espèce.
- b) le répertoire individuel, stimuable par l'antigène, est celui qui échappe à la suppression médiée entre autre par des lymphocytes T, inhibiteurs à récepteurs anti-idiotypiques.
- c) le système immunitaire d'un animal peut être reprogrammé et contraint par l'expérimentateur à l'expression d'un idiotype donné.
- d) l'existence d'un réseau idiotypique n'implique pas des réactions en chaîne se propageant par vagues successives, dans tout le système immunitaire. Il suffit de prendre en considération les premiers niveaux d'interactions.

Les expériences décrites ci-dessus nous montrent que des manipulations idiotypiques appropriées du système immunitaire peuvent induire l'expression d'un anticorps choisi par l'expérimentateur.

Les expériences des groupes de Binz et Wigzell montrent que la suppression sélective d'une réponse donnée peut être réussie également par manipulations idiotypiques. Supposons deux lignées pures de rat et de souris, caractérisées par les antigènes majeurs d'histocompatibilité A et B. N'importe quel organe de type A, greffé dans l'animal B est rejeté par le biais de lymphocytes T helpers et cytotoxiques, possédant des

structures de reconnaissance spécifiques des antigènes A (structure B anti-A). Si nous admettons l'hypothèse d'un réseau idiotypique, cette vague alloréactive doit enclencher une deuxième réponse immunitaire anti-anti-A, modulant l'intensité de la première réponse qui, elle, est responsable du rejet des greffes. L'amplification massive de cette deuxième réponse immunitaire permettrait peut-être d'annihiler l'activité des lymphocytes capables de lyser les cellules greffées.

Binz et Wigzell ont obtenu des populations lymphocytaires enrichies en cellules douées de réactivité B anti-A. Ils se sont servis de ces cellules comme antigènes en les mélangeant à des adjuvants et en les injectant à des souris de la même lignée B. Sans entrer dans les détails, Binz et Wigzell ont montré qu'en procédant de la sorte, les souris receveuses développent une réponse immunitaire de type anti-anti-A (antiidiotypique). Une proportion significative des souris manifeste un état de tolérance spécifique vis-à-vis des antigènes d'histocompatibilité de la lignée A. La durée de survie des greffes peut être considérablement allongée. Cette prolongation de survie des greffes est au moins partiellement médiée par des lymphocytes T inhibiteurs, dont les récepteurs sont antiidiotypiques par rapport aux lymphocytes helpers et cytotoxiques, responsables du rejet de la greffe.

L'hypothèse du réseau est fortement appuyée par des expériences récentes des groupes de Bénacerraf et de Nisonoff. Ces groupes ont utilisé récemment un idiotype (l'idiotype anti-arsenate) dans des expériences de suppression d'hypersensibilité différée. L'idée de base de ces expériences est que, si le langage interlymphocytaire idiotypique est important dans les circuits de régulation du système immunitaire, l'injection de lymphocytes sur la membrane desquels on a artificiellement attaché un idiotype donné, devrait perturber l'expression de cet idiotype. De fait, l'injection par voie intraveineuse de lymphocytes couplés à l'acide arsénique *dans des souris naïves* entraîne l'apparition de lymphocytes supprimeurs dont les récepteurs sont spécifiques de l'antigène et sont caractérisés par la présence de motifs idiotypiques caractéristiques des anticorps anti-ars. L'injection de ces lymphocytes supprimeurs à d'autres souris entraîne l'activation d'une deuxième vague de lymphocytes supprimeurs dont la spécificité immunologique est antiidiotypique. Ces lymphocytes de deuxième génération sont capables d'exercer une inhibition de lymphocytes de souris immunes. De nouveau, nous voyons qu'une réponse immune peut en engendrer une seconde, spécifique de la première.

VERS UN SCHÉMA DE RÉGULATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

A l'aide des éléments décrits plus haut, nous pouvons tenter d'esquisser un modèle de régulation de la réponse immunitaire. Il va de soi qu'au stade actuel de notre ignorance, ce schéma ne peut être considéré que comme une hypothèse de travail.

Dans ce schéma, nous retiendrons entre autres, les faits suivants :

- a) L'essentiel de la régulation est dû aux lymphocytes T helpers et T inhibiteurs, programmés pour donner, soit des signaux positifs de différenciation, T_H , soit des signaux négatifs (T_S). Ces lymphocytes utilisent un double système de reconnaissance.
- b) Toute réponse immunitaire dépend d'interactions cellulaires complexes entre lymphocytes B, T_H , T_S . Ces éléments peuvent être connectés, soit par l'antigène (si un antigène a plusieurs déterminants antigéniques a, b, c ..., un lymphocyte T_H anti-a peut entrer en contact avec un lymphocyte B anti-b, et peut assister ce lymphocyte B d'une autre spécificité dans sa différenciation), soit par des interactions entre parties variables de leurs récepteurs immunologiques (réactions idiotype-antiidiotype). L'effet physiologique de ces interactions dépend de la nature des lymphocytes connectés. L'interaction idiotypique est seulement un moyen de connectance entre partenaires exhibant les récepteurs appropriés. Ainsi, il y a non seulement des lymphocytes T_S à nature antiidiotypique, mais également des lymphocytes T_H à récepteurs antiidiotypiques, ainsi que le groupe de Sercarz l'a montré récemment. A l'intérieur du réseau, une même immunoglobuline est idiotype *et* antiidiotype.
- c) Le répertoire immunologique accessible à l'antigène dépend de l'état d'équilibre du réseau, au moment de l'introduction de l'antigène et de l'histoire idiotypique passée de l'animal. Ainsi, la réponse d'un système biologique ne dépend pas seulement des potentialités du système mais de son histoire.
- d) Dans la plupart des cas, les anticorps induits par un antigène sont extrêmement hétérogènes. Toutefois, si l'on compare différentes sous-populations de ces anticorps en fonction de différents critères, que nous ne détaillerons pas ici, on constate qu'il y a une «parenté idiotypique» de ces différentes sous-populations présentes chez un même individu. On peut même trouver dans un même sérum, des immunoglobulines sans fonction anticorps et partageant des

spécificités idiotypiques avec les anticorps. Ce fait que nous avons appelé «Dominance idiotypique individuelle» est attendu dans une hypothèse de réseau idiotypique. Dans un tel système de régulation, il y aura induction parallèle ou suppression parallèle de familles de clones lymphocytaires dont les récepteurs ont une parenté idiotypique. Imaginons qu'un antigène s'adresse à deux clones lymphocytaires B, dénotés a et b et dont les immunoglobulines de surface ont une affinité différente pour l'antigène. Supposons pour simplifier, qu'il n'y ait aucun partage de motifs idiotypiques entre les deux types de récepteurs. Chacun des lymphocytes B est en communication possible avec deux types de lymphocytes T_H possédant le même récepteur physiologique leur permettant d'identifier un lymphocyte B ou une cellule dendritique. Ces deux lymphocytes T_H ont des récepteurs immunologiques complémentaires, l'un ayant des spécificités idiotypiques en commun avec les immunoglobulines de surface du lymphocyte B (dénoté + ou idiotypique), l'autre étant complémentaire et anti-idiotypique (dénoté -). De la même manière, les deux lymphocytes T_H sont en connection possible avec deux lymphocytes T_S, possédant un récepteur physiologique leur permettant de reconnaître une protéine de surface caractéristique des cellules T_H. Les deux lymphocytes T_S possèdent des récepteurs immunologiques, l'un idiotypique (+), l'autre anti-idiotypique (-).

L'introduction dans le système d'un antigène capté par la membrane d'une cellule dendritique va provoquer l'activation des lymphocytes T_H et par conséquent, la différenciation des lymphocytes B. Au fur et à mesure que la concentration d'antigène va décroître, les clones de la série a, ayant une plus forte affinité pour l'antigène, vont avoir un avantage sélectif. L'affinité moyenne de l'anticorps va augmenter. Au fur et à mesure de l'accroissement des anticorps des lymphocytes T_H, il va y avoir induction des lymphocytes T_S. Les lymphocytes T_H de la série a ayant un avantage sélectif vont activer les lymphocytes T_S de leur propre série plus rapidement que les lymphocytes T_{Hb} n'induiront les lymphocytes T_{Sb}. En conséquence, le compartiment de haute affinité va être supprimé plus rapidement que le compartiment de faible affinité. La montée d'affinité va être suivie d'une descente d'affinité, en accord avec les données expérimentales. Pour expliquer le phénomène de dominance idiotypique individuelle, il

suffit de remplacer le clone a par une famille de clones a, a', a'', a''' dont les récepteurs immunologiques présentent des motifs idiotypiques similaires.

- e) Un antigène possédant plusieurs épitopes a, b, c, d ... peut mettre en relation physique étroite des circuits idiotypiques lymphocytaires qui normalement s'ignorent dans le système immunitaire lorsque l'antigène n'est pas présent. Ainsi, la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène complexe va résulter de l'apparition d'un réseau complexe.

Il est évident que nous n'avons pu aborder dans cet article qu'une toute petite partie des problèmes de régulation dans le système immunitaire. Le réseau idiotypique n'est qu'un fragment de l'ensemble. Il existe en fait toute une hiérarchie des mécanismes de régulation. Il semble qu'il y ait des mécanismes de contrôle des taux des différentes classes et sous-classes (lymphocytes T reconnaissant la partie constante des immunoglobulines ?). Le système immunitaire est lui-même en relation avec le système nerveux, le système endocrinien. Les rapports et les nombres de lymphocytes dans les différents compartiments sont vraisemblablement réglés par des hormones thymiques.

Partant d'un paradigme prokaryotique où le système immunitaire était représenté par une myriade de petits systèmes immunitaires (clones de lymphocytes) indépendants, dont les récepteurs, après la «purge» des clones interdits reconnaissaient les antigènes du non-soi, nous sommes arrivés à un concept «eukaryotique», dans lequel chaque lymphocyte «parle» à d'autres lymphocytes et où la reconnaissance du soi est la règle générale (autoréactivité vis-à-vis des idiotypes et de molécules codées par le locus majeur d'histocompatibilité). Comprendre le réseau immunitaire, c'est accéder à la logique des communications intercellulaires. Comprendre le réseau immunitaire, c'est permettre des manipulations spécifiques du système modifiant l'équilibre ou le déséquilibre du système dans un sens choisi et voulu par l'expérimentateur ou le clinicien : diminuer des phénomènes d'allergie, créer un état de tolérance spécifique vis-à-vis des antigènes de transplantation, induire une réponse spécifique vis-à-vis d'un antigène chez un malade dont le système immunitaire est incapable de répondre à cet antigène, provoquer une hyperréactivité du système immunitaire, afin de réduire la croissance d'une tumeur.

Nous terminerons en illustrant ce dernier exemple par des expériences réalisées récemment dans notre laboratoire de Rhode-St-

Genèse et par le laboratoire de Biologie Générale de l'Université de Liège. Dans plusieurs systèmes expérimentaux de tumeurs de souris, l'implantation de la tumeur est suivie de l'apparition de lymphocytes T cytotoxiques, capables de lyser les cellules tumorales.

L'action de ces lymphocytes T cytotoxiques est rapidement inhibée par une autre vague de lymphocytes inhibiteurs, qui favorisent, par conséquent, la croissance de la tumeur. Ces lymphocytes inhibiteurs ont été isolés et employés comme antigènes. Des souris de lignée pure sont préimmunisées avec les lymphocytes inhibiteurs, de manière à induire une immunité anti-suppresseurs.

L'implantation subséquente de la tumeur dans de telles souris montre une réduction importante et significative (voire une disparition) de la tumeur dans une partie des souris. La compréhension des mécanismes responsables de la réduction de la croissance des tumeurs permettra sans doute d'améliorer sensiblement les résultats obtenus. Au terme de cet article, il convient de souligner que les zones d'ombre et d'ignorance sont encore beaucoup plus vastes que les zones de lumière et de compréhension.

En particulier, l'immunologie est encore incapable d'expliquer de manière cohérente les mécanismes de la tolérance naturelle et la liaison de l'intensité d'une réponse immunitaire au locus majeur d'histocompatibilité. Ces deux grands problèmes représentent le défi pour les immunologistes de demain.

RÉFÉRENCES

- AGUET, M., ANDERSSON, L. C., WIGHT, E., BINZ, H. and WIGZELL, H.— 1978, *J. Exp. Med.*, 147 : 50.
- BINZ, H. and WIGZELL, H.— 1977 in : *Contemporary Topics in Molecular Immunology*, volume 7 (R. A. Reisfeld and F. P. Inman, eds) p. 113, Plenum Press, New York.
- BINZ, H., FRISCHKNECHT, H. and WIGZELL, H.— 1979. *Ann. Immunol. (Paris)* 130 C : 273.
- BONA, C. and HIERNAUX, J.— 1980. *Crit. Rev. Immunol.* in press.
- BONA, C. and PAUL, W. E.— 1979. *J. Exp. Med.* 149 : 592.
- BRUYN, C., URBAIN-VANSANTEN, G., PLANARD, C., DE VOS-CLOETENS, C., and URBAIN, J.— 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 : 2462.

- BURNET, F. M.— 1959. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*, Cambridge University Press, Cambridge.
- CANTOR, H. and GERSHON, R. K. 1979. *Fed. Proc.* 38 : 2058.
- CAZENAVE, P. A. 1977.— *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5122.
- DANCHIN, A. and SLONIMSKI, P.— 1982. *Biosystems*, in press.
- DORIA, G. 1978.— In : *Immunology 1978* (J. Gergely, G. A. Medgyesi and S. R. Jollan, eds), Akadémiai Kiado, Budapest.
- EICHMANN, K.— 1978. *Adv. Immunol.* 26 : 195.
- JERNE, N. K.— 1974. *Ann. Immunol.* (Paris) 125 C : 373.
- JERNE, N. K.— 1976A, *Harvey Lect.* 70 : 93.
- LEDERBERG, J.— 1959. *Science*, 129 : 1649.
- LINDENMANN, J.— 1973. *Ann. Immunol.* (Paris) 124 C : 171.
- MARIAMÉ, B., LEO, O., TASIAUX, N., URBAIN, J., BRÉZIN, C. and CAZENAVE, P. A. 1977.— *Ann. Immunol.* (Paris) 128 C : 355.
- LOUDIN, J.— 1974. *Antigens*, 2 : 277.
- RAJEWSKY, K. and EICHMANN, K. 1977.— In : *Contemporary Topics in Immunobiology*, vol. 7, T Cells (O. Stutman, ed.) p. 113, Plenum Press, N. Y.
- TASIAUX, N., LEUWENKROON, R., BRUYNS, C. and URBAIN, J.— 1978. *Eur. J. Immunol.* 8 : 464.
- TILKIN, A. F., SCHAAF-LAFONTAINE, N., VAN ACKER, A., BOCCADORO, M. and URBAIN, J.— 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 1809.
- URBAIN, J.— 1974. *Arch. Biol.* 85 : 139.
- , 1976. *Ann. Immunol.* (Paris) 127 C : 1121.
- , 1978. In : *Immunology 1978* (J. Gergely, G. A. Medgyesi and S. R. Jollan, eds), p. 47, Akadémiai Kiado, Budapest.
- URBAIN, J., VAN ACKER, A., DE VOS-CLOETENS, C. and URBAIN-VANSANTEN, G.— 1972. *Immunochemistry* 9 : 121.
- URBAIN, J., TASIAUX, N., LEUWENKROON, R., VAN ACKER, A., MARIAMÉ, B.— 1975. *Eur. J. Immunol.* 5 : 570.
- URBAIN, J., WIKLER, M., FRANSSSEN, J. D. and COLLIGNON, C.— 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5126.
- URBAIN, J., COLLIGNON, C., FRANSSSEN, J. D., MARIAMÉ, B., LEO, O., URBAIN-VANSANTEN, G., VAN DE WALLE, P., WIKLER, M., and WUILMART, C.— 1979. *Ann. Immunol.* (Paris) 130C : 281.
- URBAIN, J., CAZENAVE, P. A., WIKLER, M., FRANSSSEN, J. D., MARIAMÉ, B. and LEO, O.— 1980. In : *Immunology 1980* (J. Dausset and M. Fougereau, eds) p. 81, Academic Press, New York.
- URBAIN-VANSANTEN, G., VAN ACKER, A., MARIAMÉ, B., TASIAUX, N., DE VOS-CLOETENS, C., and URBAIN, J. — 1979. *J. Ann. Immunol.* (Paris) 130C : 397.

- VAN ACKER, A., URBAIN-VANSANTEN, G., DE VOS-CLOETENS, C., TASIAUX, N.,
and URBAIN, J.- 1979b. *Ann. Immunol. (Paris)* 130C : 385.
- WIKLER, M., FRANSSEN, J. D., COLLIGNON, C., LEO, O., MARIAMÉ, B., VAN DE
WALLE, P., DE GROOTE, D., and URBAIN, J.- 1979. *J. Exp. Med.*, 150 :
184.
- WIKLER, M., DEMEUR, C., DEWASME, G. and URBAIN, J.- 1980. *J. Exp. Med.*
152 : 1024.
- ZINKERNAGEL, R. M.- 1978. *Immunol. Rev.* 42 : 24.
-

Jean Brachet

Titre IX
Le prélude à la Morphogénèse :
un exemple de l'unité
et de la diversité du vivant

Omne vivum ex ovo
William Harvey.
(1578-1657).

Au début du XIX^e siècle, von Baer avait déjà noté que chez les organismes voisins, comme les vertébrés, les premières étapes du développement de l'embryon restent très semblables. C'est seulement assez tard au cours de ce développement que se manifestent les divergences. Celles-ci portent moins sur la structure des types cellulaires que sur le nombre et la position des cellules. (F. Jacob : «Le jeu des possibles», 1981).

RÉSUMÉ

L'étude du développement embryonnaire permet de suivre la transformation de l'œuf en une larve, puis en un adulte. La transformation d'un œuf en une poule, avec toute la diversification que cela comporte, n'a cessé d'intriguer l'esprit humain depuis l'Antiquité. Après une esquisse de l'histoire de l'Embryologie, on décrit sommairement les principales étapes du développement embryonnaire, en insérant dans ce contexte l'essentiel des résultats obtenus par les chercheurs du Département de Biologie moléculaire de l'U.L.B. Les données obtenues sur les œufs de diverses espèces animales sont confrontées avec celles recueillies sur une algue unicellulaire, *Acetabularia mediterranea*. On conclut que les lois de la Biologie moléculaire sont universelles malgré la diversité infinie des êtres vivants : malgré des différences morphologiques profondes, l'algue unicellulaire, l'œuf, l'embryon et l'adulte obéissent aux mêmes lois universelles.

1. GÉNÉRALITÉS

Il est malaisé de dire, en peu de mots, ce qui distingue l'être vivant du monde «inanimé» dans lequel il vit. Certes l'être vivant respire, se nourrit, est doué (à des degrés d'ailleurs très divers) de sensibilité et de motilité ; mais un monstre purement mécanique, une automobile par exemple, se nourrit de l'essence qu'elle oxyde ; cette machine avance, recule, vire, s'arrête, répond au frein et à l'accélérateur. L'homme n'est pas indispensable pour contrôler les diverses réactions du véhicule : un robot bien programmé pourrait en faire meilleur usage qu'un conducteur peu doué. Ce qui distingue surtout l'être vivant de la machine, c'est sa capacité de se reproduire tout en transmettant à ses descendants les caractéristiques de son *hérédité*. Même la forme la plus élémentaire de reproduction, la reproduction asexuée par division, fait défaut à la machine. Répétons-le, hérédité et reproduction sont les deux caractéristiques majeures du vivant. L'étude de l'hérédité, la Génétique est traitée ailleurs dans ce fascicule. La reproduction, qui nous intéresse ici, se manifeste sous des modalités différentes chez les êtres vivants ; simple division (scissiparité) chez les organismes inférieurs, elle s'est compliquée et perfectionnée, au cours de l'Evolution, avec l'apparition de cellules spécialisées : ce sont les gamètes, œufs et spermatozoïdes, qui assurent la reproduction sexuée. La fusion des gamètes, lors de la fécondation, a des conséquences prodigieuses : mise en route du développement embryonnaire, détermination du sexe chez de très nombreuses espèces, mélange des caractères héréditaires paternels et maternels. C'est à la fécondation que l'œuf acquiert un «programme» de développement, qui se déroulera jusqu'à la sénescence, puis à la mort. C'est à ce moment que la combinaison des gènes paternels et maternels assure à chacun d'entre nous son cachet personnel.

Rien ne frappe plus l'observateur de la Nature que la *diversité* des êtres vivants : les espèces animales et végétales sont presque innombrables et l'homme préhistorique distinguait fort bien, à en juger par ses peintures murales, un mammoth d'un cervidé. Cette diversité se manifeste au sein de chaque espèce, où chaque individu a son cachet particulier. Seuls les jumeaux «identiques» se ressemblent à s'y méprendre. Pourquoi ? Parce qu'ils ont reçu, au moment de la fécondation de l'œuf qui leur a donné naissance, le même patrimoine héréditaire, les mêmes molécules d'*acide désoxyribonucléique* (DNA). C'est dans l'infinie variété des combinaisons entre les séquences des

bases constitutives du DNA qu'il faut chercher l'origine de la diversité des êtres vivants ; certaines de ces séquences constituent les *gènes*, qui sont transmis suivant les lois de Mendel et qui sont localisés dans les chromosomes. L'organisation de ces séquences, surtout celles qui ne correspondent pas à des gènes et qui ne sont donc pas absolument nécessaires à la survie de l'organisme, peuvent varier d'un individu à l'autre, donc manifester un « polymorphisme » génétique. Par contre, les séquences de DNA réellement indispensables à la vie ont été remarquablement conservées au cours de l'Evolution ; il existe des homologies frappantes entre les séquences des bases du DNA, lorsqu'on compare par exemple les gènes des hémoglobines des légumineuses, des Insectes ou de l'homme.

Toutefois, il ne suffit pas pour qu'un caractère héréditaire se manifeste (par exemple, la pigmentation des cheveux ou de la peau) que la séquence du DNA qui détermine ce caractère soit présente dans la chromatine des noyaux : il faut que le gène puisse *s'exprimer*, c'est-à-dire qu'il soit actif. C'est le grand mérite de la Biologie moléculaire d'avoir démontré que les mécanismes d'expression des gènes sont universels, qu'ils sont fondamentalement les mêmes chez la bactérie et chez l'homme. Derrière la diversité quasi infinie des êtres vivants (de leur aspect extérieur, c'est-à-dire leur *phénotype*) se dissimule une unité d'une surprenante monotonie. La loi fondamentale à laquelle obéissent tous les êtres vivants est simple : le DNA de la chromatine (donc les gènes) peut soit *se répliquer* (DNA \rightarrow DNA) lorsque la cellule va se diviser en deux, soit être transcrit en acide ribonucléique (DNA \rightarrow RNA). Le RNA est alors *traduit*, dans le cytoplasme, en protéines spécifiques (RNA \rightarrow protéines). Le passage de l'information génétique du DNA nucléaire à la protéine cytoplasmique correspondante peut donc être contrôlé à deux niveaux principaux : la transcription du gène en RNA messenger, la traduction de celui-ci en une protéine spécifique (l'hémoglobine par exemple). Cette traduction se fait correctement grâce au code génétique qui est universel (sauf pour le DNA des mitochondries, organites producteurs d'énergie de la cellule).

Deux grandes tendances se manifestent dans la Biologie actuelle : l'Ecologie, appuyée sur la Zoologie et la Botanique systématiques, ainsi que sur l'Anatomie comparée, met l'accent sur la diversité des êtres vivants. La *Biologie moléculaire*, science multidisciplinaire située au carrefour de la Biologie, de la Chimie et de la Physique, cherche à expliquer l'être vivant par les propriétés des molécules (en particulier

les acides nucléiques et les protéines) qui les constituent. Les biologistes moléculaires ne sont pas moins intéressés par le problème de l'Evolution des êtres vivants que leurs Collègues zoologistes et botanistes. Ils en retracent l'histoire en comparant la structure fine des gènes (c'est-à-dire la séquence des bases dans le DNA) ou celle des protéines (établissement de la séquence de leurs acides aminés) chez les êtres vivants les plus divers allant des bactéries à l'homme. L'utilisation de bases paléontologiques permet d'estimer quand (c'est-à-dire il y a combien de millions d'années) deux espèces animales ont divergé ; l'analyse détaillée de leur DNA permet de se faire une idée des mécanismes moléculaires qui ont conduit à la séparation des deux espèces. Ces mécanismes sont complexes et ne se limitent pas aux classiques mutations ponctuelles (substitution d'une base du DNA par une autre) : il s'est produit au cours du temps des duplications de gènes, des insertions de nouvelles séquences, des délétions d'autres séquences, etc. Aujourd'hui, le DNA n'est plus – comme on le croyait il y a dix ans – une molécule immuable : cessant d'être un dieu, il devient, à chaque nouvelle découverte de la Biologie moléculaire, plus souple, plus «humain».

On comprendra aisément, à la lecture de ce qui précède, que les embryologistes et les cytologistes qui travaillent au Département de Biologie moléculaire de l'U.L.B. se sont intéressés davantage à ce qui est commun aux êtres vivants (donc à l'*unité* du vivant) qu'à ce qui les diversifie. L'auteur de ces lignes en porte la responsabilité parce qu'il s'est intéressé, pendant plus d'un demi-siècle, aux *interactions globales entre le noyau et le cytoplasme* dans les œufs et les organismes unicellulaires. Ces recherches, qui seront résumées plus loin ont démontré que ces interactions obéissent à des règles universelles, qui découlent des lois de la Biologie moléculaire : elles sont les mêmes chez l'algue verte unicellulaire *Acetabularia mediterranea*, l'amibe, l'œuf d'oursin ou de grenouille. Comme nous le verrons, l'*embryogénèse* comporte une série de stades que l'on retrouve, dans leurs grandes lignes, chez toutes les espèces animales : formation de l'œuf vierge (oogénèse et maturation), fécondation, segmentation, mouvements morphogénétiques conduisant à la gastrula, formation des divers organes (organogénèse) et, enfin, différenciation de ceux-ci en tissus spécifiques (muscles, système nerveux, squelette, etc.). Ce sont surtout les premiers stades du développement, qui constituent en fait une *préparation* à l'embryogénèse proprement dite, qui ont retenu

l'attention des chercheurs de Rhode : en effet, l'œuf est une cellule et ce qui est valable pour lui est valable pour toute cellule (encore l'unité du vivant !). Toutefois, l'œuf est une cellule différenciée : c'est la seule de nos cellules qui soit «totipotente», c'est-à-dire capable de donner naissance à un organisme complet, appartenant à la même espèce que ses parents.

Après ces généralités et avant d'entrer dans le vif du sujet, voyons rapidement comment l'Embryologie s'est développée au cours des temps.

2. DE L'EMBRYOLOGIE DESCRIPTIVE À L'EMBRYOLOGIE MOLÉCULAIRE

L'Embryologie, la science qui s'occupe du développement des organismes depuis la formation de l'œuf jusqu'à l'état adulte, présente sa propre embryologie : elle est née petit à petit à partir de données confuses et rudimentaires ; elle s'est successivement intéressée à la description du développement embryonnaire, à son analyse expérimentale, à sa compréhension sur le plan biochimique. Un magnifique avenir s'ouvre à elle ; mais elle vieillira et finira, comme tout ce qui est vivant, par mourir.

Nul ne peut dire quand l'homme a commencé à s'intéresser au mystère de la morphogénèse, c'est-à-dire à l'apparition harmonieuse de formes et de fonctions nouvelles. Nous savons que des incubateurs artificiels existaient en Chine et en Egypte de nombreux siècles avant notre ère ; il serait bien étonnant que la curiosité des Chinois et des Egyptiens n'ait pas été éveillée, dès ce moment, et que l'un d'entre eux n'ait pas brisé, de temps à autre, la coquille d'un œuf de poule incubé et observé l'embryon en voie de développement : il faisait, sans s'en douter, de l'Embryologie descriptive. C'est à Aristote que nous devons la première description écrite du développement embryonnaire chez la poule ; dans son «Histoire des animaux» il a, comme l'a remarqué J. Needham, noté un fait important : l'extrémité antérieure (céphalique) de l'embryon se développe plus rapidement que son extrémité postérieure (caudale). Il existe donc, dans l'embryon, ce que nous appelons aujourd'hui un gradient morphogénétique, décroissant d'intensité dans le sens céphalo-caudal. L'élucidation des bases moléculaires de tels gradients demeure l'une des tâches devant lesquelles l'embryologie moléculaire est confrontée.

L'Embryologie ne fit guère de progrès avant la Renaissance. Notons, toutefois, la curieuse théorie proposée par l'illustre théologien, Albert, le Grand, dont l'Eglise a fait l'un de ses Saints, au XII^e siècle : l'œuf de poule donnerait naissance à un coq si sa forme se rapproche de celle de la sphère (figure géométrique parfaite), à une poule s'il est allongé. Il a fallu attendre la fin du XVIII^e siècle pour que l'inexactitude de ces vues purement théoriques soient soumises à l'expérimentation. Aujourd'hui, un enfant de 10 ans, séparerait les œufs de formes différentes, les placerait dans un incubateur et verrait qu'il n'existe aucune relation entre la forme d'un œuf et le sexe du poussin.

L'exemple d'Albert le Grand (dont le nom était simplement De Groot) montre combien il convient de se méfier des idées préconçues : la supériorité du «principe mâle» sur le «principe femelle» est une sottise pour l'embryologiste qui sait qu'un œuf peut se développer par parthénogénèse, alors qu'un spermatozoïde ne peut rien donner du tout ; il montre aussi que les théories, hypothèses, modèles doivent être soumis au contrôle rigoureux de l'observation et de l'expérience avant d'être acceptables, quelles que soient l'autorité et l'ingéniosité de leurs inventeurs.

L'Embryologie a débuté, tout naturellement, par la *description* du développement de l'œuf ; cette Embryologie descriptive n'a pas cessé d'évoluer en fonction des progrès techniques (loupes et microscopes composés jadis, microscopes électroniques aujourd'hui). Le développement embryonnaire des espèces les plus variées a été scruté de près et l'*Embryologie comparée*, qui est sortie de ces patientes études, a apporté un appui important à la théorie de l'Evolution des espèces.

Mais l'homme, tel l'enfant qui démonte un réveil pour découvrir la «petite bête» qui le fait marcher, ne peut pas se contenter d'observer et de décrire : il veut essayer de comprendre les causes des phénomènes qu'il a constatés. C'est ainsi qu'est née l'*Embryologie expérimentale* (encore appelée Embryologie *causale* par Albert Brachet), dont l'un des pionniers fut l'abbé Spallanzani qui réussit, peu avant la Révolution française, la fécondation artificielle des œufs de grenouille. Il fut aussi un pionnier de l'Embryologie chimique, puisqu'il tenta de savoir si ces œufs se développent dans le vide de la machine de Boyle, c'est-à-dire en anaérobiose. Et pourtant, quel exemple de parti pris, basé sur des idées préconçues, nous donne Spallanzani, lorsqu'il arrive à l'interprétation de ses étonnantes expériences : Spallanzani était «oviste», donc adversaire des «animalculistes» ; il a dès lors conclu de ses expériences

que les œufs de grenouille ne sont pas des œufs mais des têtards et que les «vers spermatiques» (les spermatozoïdes) ne jouent aucun rôle dans la fécondation : cette conclusion est en contradiction flagrante avec les expériences de filtration du sperme effectuées par Spallanzani lui-même. Que le jeune chercheur qui se hasardera dans la voie parsemée d'embûches de l'Embryologie moléculaire n'oublie pas les bévues commises par deux hommes pourtant exceptionnels, Albert le Grand et Spallanzani, lorsqu'il cherchera à interpréter les résultats de ses expériences.

C'est au début de ce siècle, sous l'influence d'hommes tels que Bataillon, Delage, Van Beneden, A. Brachet, Boveri, W. Roux, Driesch, Wilson, Harrison, etc. que l'Embryologie causale a pris son essor et que l'œuf en voie de développement a été analysé par les méthodes expérimentales les plus variées.

Retenons, pour l'instant, qu'il existe *grosso modo*, deux types d'œufs : les uns sont une mosaïque de territoires destinés à donner naissance à tel ou tel organe ; la destruction ou l'ablation peu après la fécondation de l'une de ces localisations germinales provoque des altérations irréparables du développement. Par contre, d'autres œufs (dont ceux des ammières) présentent des capacités étonnantes de *régulation* : si on sépare les deux premières cellules au moment où l'œuf fécondé se divise en deux blastomères, chacun de ces deux blastomères peut donner naissance à un individu complet. C'est ce mécanisme qui produit des jumeaux identiques, qui sont toujours du même sexe.

C'est vers le même moment que la naissance de la Biochimie a permis à l'*Embryologie chimique* de prendre corps. Les recherches, dans ce domaine, ont été longtemps purement descriptives et ont consisté à analyser les principaux constituants de l'œuf au cours de son développement (teneur en protéines, glycogène, lipides, eau, sels, etc.). La somme énorme de documents accumulés jusqu'en 1930 a été résumée dans l'ouvrage gigantesque de Joseph Needham, *Chemical Embryology*. Il faut bien avouer que, parmi ces innombrables données biochimiques, bien peu apportent quelque chose d'important à la compréhension de la différenciation embryonnaire.

Le passage de l'Embryologie chimique à l'Embryologie moléculaire a été insensible pour certains (à l'auteur de cet article, par exemple, qui s'est intéressé aux acides nucléiques et à la synthèse des protéines bien avant que le terme de «Biologie moléculaire» ne soit inventé), brutal

pour d'autres. Une révolution dans nos idées s'est produite à la suite du développement prodigieux de nos connaissances dans le domaine de la Génétique moléculaire des procaryotes. Il est désormais impossible d'essayer d'expliquer le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire sans tenir compte de la structure en double hélice de l'ADN (acide désoxyribonucléique) imaginée par Watson et Crick, du mécanisme de sa répllication, du code génétique, du contrôle de l'activité génétique découvert par Jacob et Monod, du mécanisme des mutations, etc.

Les causes profondes de la différenciation cellulaire chez les organismes supérieurs (Eucaryotes) nous échappent encore et elles restent l'une des plus passionnantes énigmes de la Biologie actuelle. Il est réconfortant de voir, en ce moment même, des biologistes moléculaires venir à l'Embryologie et des embryologistes se mettre à penser en termes moléculaires. C'est en confrontant les idées, en faisant appel à tout l'arsenal des techniques forgées dans l'immense domaine de la biologie moléculaire, que le mot de l'énigme sera trouvé.

3. ESQUISSE DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

La première étape de l'embryogenèse est la *gamétogenèse* : l'oogénèse et la spermatogénèse ont lieu respectivement dans l'ovaire et le testicule. La gamétogenèse conduit à la production de deux cellules très différentes, toutes deux hautement spécialisées : l'*œuf* et la *spermatozoïde* (figs. 1 et 2).

L'ovaire donne naissance, pendant toute la durée de la vie sexuellement active de la femelle à des *oocytes* ; ce sont des cellules volumineuses, généralement sphériques. Comme toute cellule, l'oocyte a un noyau (la vésicule germinative) et un cytoplasme. La grande taille des oocytes mûrs résulte de l'accumulation d'un matériel de réserve, le vitellus. Ce vitellus, dont l'abondance conditionne la taille de l'oocyte, n'est pas élaboré par l'oocyte lui-même : dans le cas de la poule, par exemple, le vitellus (jaune de l'œuf) est synthétisé par le foie de l'organisme maternel ; les protéines qui donneront naissance au vitellus (vitellogénine) passent du foie dans le sang, d'où elles sont captées par les oocytes en voie de croissance dans l'ovaire. Le vitellus constitue un matériel de réserve inerte qui est utilisé par l'embryon jusqu'au moment où il devient capable de se nourrir. Les œufs de la plupart des Mammifères n'ont pas (ou très peu) de vitellus, parce que les jeunes

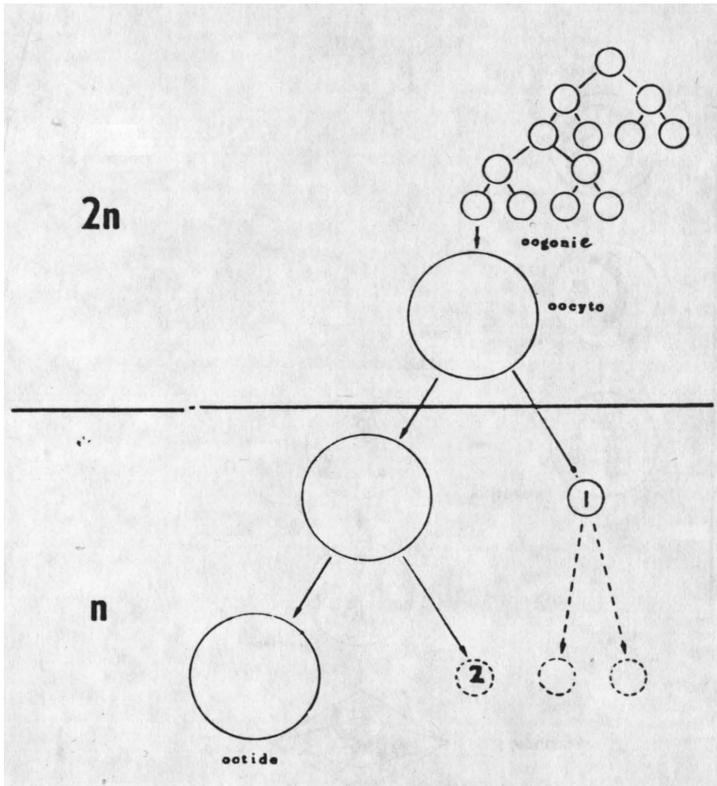


FIG. 1. — Représentation schématique de l'oogénèse : les cellules-mères (oogonies) se multiplient, puis grandissent pour former l'oocyte. Quand celui-ci a atteint sa taille maximale, il subit sa maturation (expulsion des deux globules polaires [1, 2] qui dégègèrent, formation de l'œuf vierge ou ootide). $2n$: phase diploïde, n : phase haploïde.

embryons s'implantent dans l'utérus de l'organisme maternel ; c'est celui-ci qui les nourrit. Il n'est peut-être pas sans intérêt de faire remarquer ici que la caséine du lait et les vitellogénines des œufs appartiennent à une même famille de protéines (les phosphoprotéines). A part l'accumulation de vitellus en quantités variables selon l'espèce considérée, l'oogénèse présente une remarquable unité dans tout le règne animal. Nous aurons à en reparler assez longuement plus loin. L'espèce sur laquelle ont surtout porté nos études est *Xenopus laevis*, un crapaud de l'Afrique du Sud : l'oocyte mûr atteint 1.2 à 1.3 mm de diamètre ; il constitue donc un intermédiaire entre les petits oocytes de

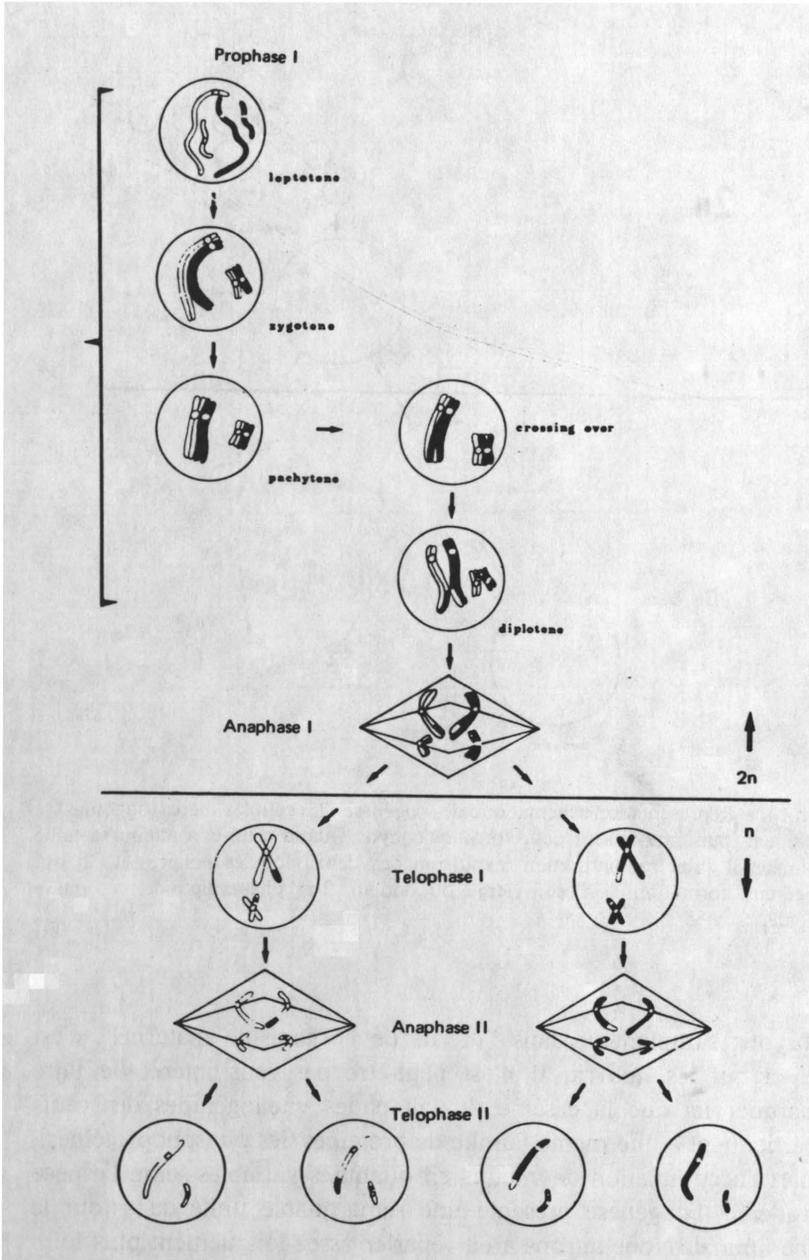


FIG. 2. - Meiosis (nuclear changes).

l'oursin, de la souris ou de la femme (0.1 mm de diamètre ou même moins) et les oocytes géants de la poule ou de l'autruche.

L'oogénèse est suivie par la *maturation*, qui transforme l'oocyte en un œuf mûr fécondable ; c'est à ce moment, que se produit la *réduction chromatique*, qui réduit, dans la proportion de 4 à 1 la quantité d'ADN présente dans le noyau (fig. 3).

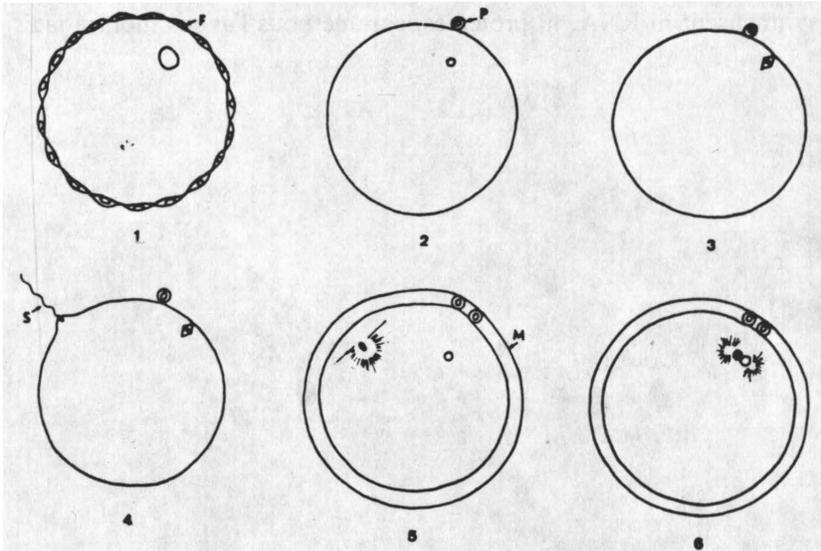


FIG. 3. - Représentation schématique de la *maturation* et de la *fécondation* chez les Amphibiens. 1) oocyte entouré de cellules folliculeuses (F). 2) élimination du 1^{er} globule polaire. 3) œuf vierge mûr : la maturation est bloquée en métaphase de la 2^e mitose de maturation. 4) le spermatozoïde touche la membrane de l'œuf. 5) la maturation s'est achevée (le 2^e globule polaire a été expulsé) et le pronucleus mâle (noyau du spermatozoïde) s'est entouré d'un spermaster ; la membrane de fécondation (M) s'est soulevée. 6) les 2 pronuclei se fusionnent (amphimixie).

La spermatogénèse conduit aussi à la formation de cellules haploïdes par réduction chromatique. Les *spermatozoïdes* sont des cellules hautement différenciées. Leur morphologie diffère, d'une espèce à l'autre, par des détails que la microscopie électronique a bien mis en évidence. Mais, d'une façon très générale, la forme et la fonction des spermatozoïdes sont semblables dans tout le règne animal : le noyau haploïde (n chromosomes), à chromatine particulièrement condensée et

dépourvu de nucléoles, est précédé par un granule, l'acrosome et suivi par la pièce intermédiaire riche en mitochondries ; un long flagelle ondulant permet au spermatozoïde de se mouvoir. En fait, le spermatozoïde est une machine parfaitement adaptée à sa fonction : l'injection du matériel génétique qu'il possède, c'est-à-dire son DNA, dans l'œuf. Les mitochondries servent, comme dans toute cellule, à produire l'énergie nécessaire à la motilité. Les spermatozoïdes ne synthétisent ni RNA, ni protéines, comme nous l'avons montré jadis.

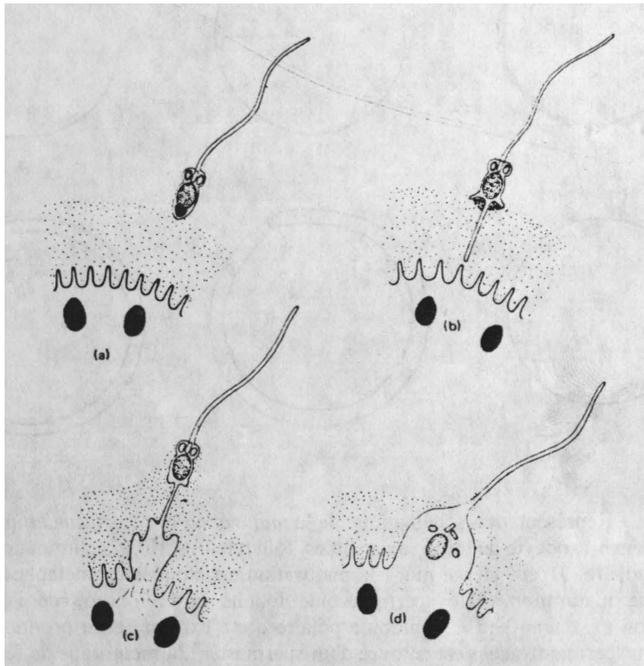


FIG. 4. – Représentation schématique des *stades initiaux de la fécondation* vus au microscope électronique. *a)* Un spermatozoïde entre en contact avec la gangue qui entoure l'œuf vierge. *b)* la réaction de l'acrosome se produit : le filament acrosomial s'est dévidé. *c)* La membrane de l'oocyte et celle de l'acrosome se sont fusionnées. *d)* Le noyau du spermatozoïde est «injecté» dans l'œuf et devient le pronucleus mâle.

L'acrosome intervient dans la *fécondation* dont les étapes principales (formation d'une membrane de fécondation, migration et fusion des pronuclei) sont schématisées dans les figs. 3 et 4. C'est seulement au moment où les deux pronuclei mâle et femelle se fusionnent

(*amphimixie*) que la fécondation est complète ; l'œuf fécondé, appelé le *zygote*, est maintenant diploïde ($2n$ chromosomes). Il va très rapidement répliquer son DNA et entrer en mitose. La fécondation est un phénomène universel qui ne présente, dans le règne animal, que des variations mineures sur un même thème. On l'a surtout étudiée chez les œufs d'oursin parce qu'ils sont petits, transparents et abondants ; ils se prêtent donc fort bien aux études morphologiques et biochimiques.

La fécondation est suivie de la *segmentation*, succession rapide de divisions mitotiques : sans que l'œuf change de volume, les cellules qui dérivent des divisions répétées deviennent de plus en plus nombreuses et plus petites ; ces clivages successifs donnent naissance à une *morula*, puis à une *blastula*. Il y a plusieurs types de segmentation conditionnés par l'abondance et la localisation du vitellus : à l'unité – à des détails près – que nous avons rencontrée jusqu'ici succède une diversité qui ira en s'amplifiant au cours de l'ontogénèse. Cependant, les premiers clivages d'œufs d'espèces aussi éloignées que l'oursin et la souris (tous deux pauvres en vitellus) se ressemblent à s'y méprendre comme le montre la fig. 5. Chez beaucoup d'espèces, il apparaît une cavité de segmentation (le blastocèle), remplie d'un liquide entre les blastomères ; le mécanisme de sa formation, chez les Amphibiens, a fait l'objet d'une étude ultrastructurale fouillée de P. Van Gansen et A. Schram. L'œuf d'oursin en segmentation, a joué un rôle d'une importance exceptionnelle dans notre compréhension de la division cellulaire : il a permis, pour la première fois, d'isoler l'*appareil mitotique* (fuseau, asters et chromosomes) et de l'analyser (Mazia et Dan) ; ce sont aussi des recherches sur l'œuf d'oursin en segmentation qui ont permis de comprendre comment se forme et progresse le *sillon* qui divise, à la fin de la mitose, la cellule en deux cellules filles. Les œufs en voie de segmentation constituent un matériel de choix pour l'étude de la *réplication du DNA* : avant chaque division, la quantité de DNA présente dans le noyau double exactement. Cette phase de synthèse du DNA (appelée phase S du cycle cellulaire) dure plusieurs heures dans nos cellules ; mais, dans l'œuf en voie de segmentation (à l'exception de ceux des mammifères), elle est réduite à quelques minutes ; moins de 4 minutes suffisent pour la réplication de la totalité du génome lors des premières divisions de l'œuf de drosophile, alors qu'il en faut une dizaine pour la réplication du beaucoup plus petit génome bactérien. Enfin, l'œuf en voie de clivage constitue un matériel idéal pour l'expérimentation embryologique : il est facile de détruire ou d'isoler un

blastomère défini et d'en suivre les conséquences ; la segmentation est donc le stade de choix pour l'étude expérimentale des localisations germinales et de la régulation embryonnaire auxquelles nous avons déjà fait allusion. Nous trouverons plus loin des exemples de ce type d'analyse.

La suite du développement embryonnaire est placée sous le signe de la diversité et relève du domaine de l'Embryologie comparée. Nous nous limiterons ici à une brève esquisse du développement des *Amphibiens* parce que ce sont leurs œufs qui ont surtout été étudiés au Département de Biologie moléculaire de l'ULB. L'étape qui suit la segmentation est la transformation de la blastula en une *gastrula*, larve tridermique. La gastrulation se caractérise par d'importants déplacements en masse de cellules : ces mouvements morphogénétiques l'emportent de beaucoup en importance sur l'activité mitotique pendant cette étape du développement. Ces mouvements coordonnés de nombreuses cellules sont trop complexes pour pouvoir être présentés ici. Mais il convient de noter que, à la suite des mouvements gastruléens, le chordoblaste entre en contact intime avec le neuroblaste. C'est ce dernier qui va donner naissance à la totalité du système nerveux (cerveau, yeux, moelle épinière, nerfs périphériques, etc.) ; rien ne permet, dans la gastrula, de distinguer morphologiquement les cellules du *neuroblaste* de celles de l'*ectoblaste* (Ec) qui le prolonge du côté ventral et qui donne surtout naissance à la peau. Dans la jeune gastrula, l'ectoblaste et le neuroblaste sont interchangeable ; isolés et mis en culture, ils ne donnent qu'un épiderme rudimentaire. Ce qui détermine le sort des deux territoires embryonnaires, c'est leur *position* dans l'embryon : du côté dorsal, le neuroblaste subit un effet *inducteur* provenant du chordoblaste sous-jacent. Si un fragment d'ectoblaste de jeune blastula est accolé à un fragment de chordoblaste, il subit cet effet inducteur et se transforme en système nerveux ; mais si on répète l'expérience avec de l'ectoblaste d'une gastrula avancée, il n'y a plus de transformation en système nerveux : au cours de la gastrulation, l'ectoblaste perd sa «compétence» à répondre au stimulus inducteur provenant du chordoblaste : un premier signe de vieillissement, de sénescence est donc déjà décelable chez un très jeune embryon ! Comme on le voit, la gastrulation est dominée par les *interactions entre cellules* ; nous aurons à en reparler.

Les phénomènes d'induction jouent encore un rôle important dans le développement embryonnaire à des stades plus tardifs : le cristallin, le

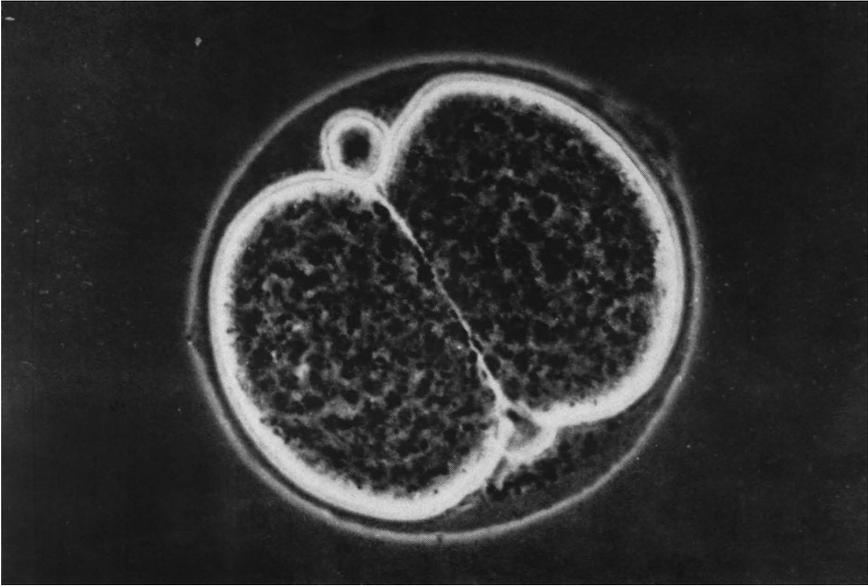


FIG. 5.

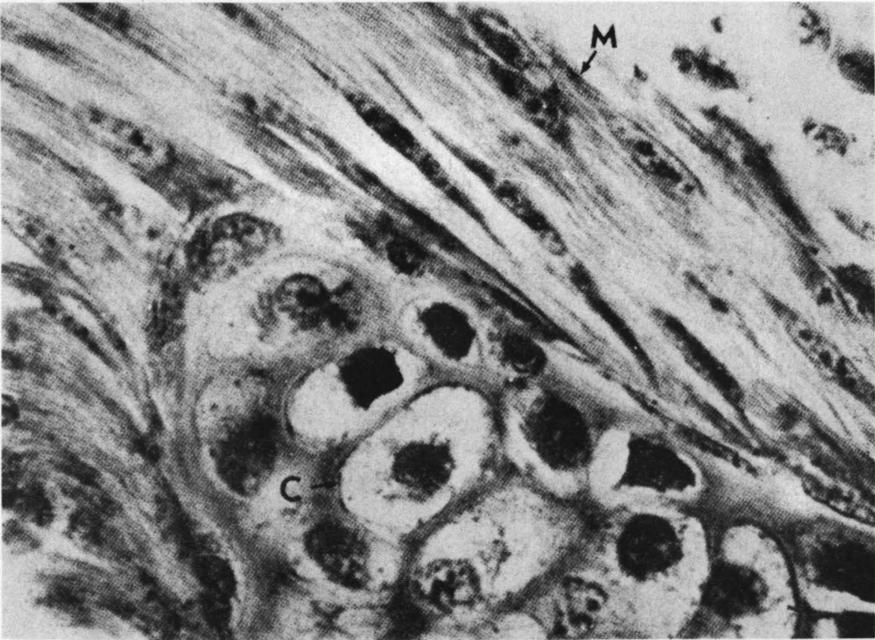


FIG. 6. - Différenciation cellulaire dans un embryon de Batracien. C. : cellules cartilagineuses. M. : cellules musculaires.

pancréas, les reins, etc. se forment à la suite d'interactions entre des cellules compétentes et des cellules inductrices d'origine embryonnaire différente. Le jeu de ces interactions conduit à la formation de la *neurula*, puis du *têtard*. C'est au cours de la neurulation qui se réalise l'*organogénèse* : la *neurula* possède un *système nerveux* tubulaire, surmontant la *chorde* dorsale qui est flanquée de *somites*. A ce stade, toutes les cellules se ressemblent encore morphologiquement : on reconnaît les organes de la *neurula* à leur localisation topographique, non à des caractères cytologiques particuliers (sauf pour la *chorde* dont les cellules sont très turgescentes). Mais si on attend un jour de plus, le *somite* indifférencié s'est transformé en cellules cartilagineuses et en cellules musculaires aisément reconnaissables sous le microscope (fig. 6) ; des neurones ont fait leur apparition dans le système nerveux, des globules rouges dans le mésoderme ventral, etc. Nous pouvons suivre la *différenciation* embryonnaire, la prodigieuse diversification en cellules désormais spécialisées. Cette différenciation ne porte pas seulement sur l'aspect morphologique des cellules, mais aussi sur leur composition biochimique et leur fonction physiologique : par exemple, seules les cellules-mères des globules rouges sont capables de synthétiser l'hémoglobine nécessaire au transport de l'oxygène dans tout l'organisme.

Une dernière remarque pour conclure cette brève esquisse de l'ontogénèse : lors des stades initiaux du développement (oogénèse, maturation, fécondation, segmentation) c'est le *cytoplasme* qui joue le rôle principal dans le développement. Ce fait est démontré notamment par de jolies expériences de Jean Pasteels qui en centrifugeant légèrement des œufs d'Amphibiens (ce qui n'affecte que l'organisation du cytoplasme) a obtenu des embryons microcéphales. Si un tel bouleversement du cytoplasme s'était produit dans les œufs humains qui nous ont donné naissance, je n'aurais pas de neurones pour écrire cet article et vous n'auriez pas d'yeux pour le lire. A partir de la gastrulation, ce sont les *noyaux* qui acquièrent une importance décisive : la différenciation des globules rouges, par exemple, n'est possible que si les gènes qui dirigent la synthèse de l'hémoglobine sont activés. Comment se réalise l'*activation sélective* d'un petit nombre de gènes, à un certain stade du développement et dans une région bien définie de l'embryon, reste un mystère ; ce mystère est important puisque les cellules cancéreuses se distinguent très souvent des autres par leur incapacité à se différencier. Tout progrès dans notre

compréhension des mécanismes moléculaires de la différenciation cellulaire ne peut manquer d'avoir des retentissements dans le domaine de la cancérologie expérimentale. Ces mécanismes moléculaires sont d'ailleurs de mieux en mieux connus ; il est désormais clair qu'il ne s'agit pas d'un mécanisme unique, mais de la coordination harmonieuse des nombreux mécanismes régulateurs qui contrôlent l'expression des gènes.

Une conséquence, en principe prévisible, de ce qui vient d'être dit au sujet de la prépondérance du cytoplasme au début de l'ontogénèse et de la suprématie du noyau lors de la différenciation embryonnaire plus tardive est la suivante : lors des premières étapes du développement le contrôle de la synthèse des protéines doit se situer surtout au niveau de la *traduction* (RNA — protéines) ; aux stades plus tardifs, ce sont les contrôles au niveau de la *transcription* (DNA — RNA) qui doivent constituer la clé de voûte de l'édifice. En effet, la transcription est une fonction du noyau cellulaire alors que la traduction a lieu dans le cytoplasme.

4. L'OOGÉNÈSE DES AMPHIBIENS (1)

Comme nous l'avons déjà vu, l'oogénèse est la période préparatoire au développement embryonnaire ; c'est le moment où la cellule germinale femelle synthétise et accumule les différents matériaux qui sont utilisés, après la fécondation, pour l'édification de l'embryon.

La morphologie de l'oocyte en croissance a été décrite en détails par P. Van Gansen dans un chapitre (sous presse) du *Traité de Zoologie* dirigé par P. P. Grassé (Ed. Masson, Paris ; l'oogénèse des Amphibiens a fait aussi l'objet d'un article général que nous avons publié dans *Endeavour* (3, 144-149, 1979).

L'oocyte est une cellule en méiose où la phase diplotène se prolonge pendant des mois, il n'en sortira que lors de la maturation. Il se caractérise, on l'a vu, par sa grande taille et par la possession d'un noyau volumineux, la *vésicule germinative*. Le matériel génétique y est dispersé sous la forme de *chromosomes plumeux* (fig. 7), qui baignent dans un abondant suc nucléaire.— Les chromosomes homologues sont

(1) Cfr. pour plus de détails, le rapport quinquennal d'activités de A. Ficq au Ministère de la Recherche scientifique.

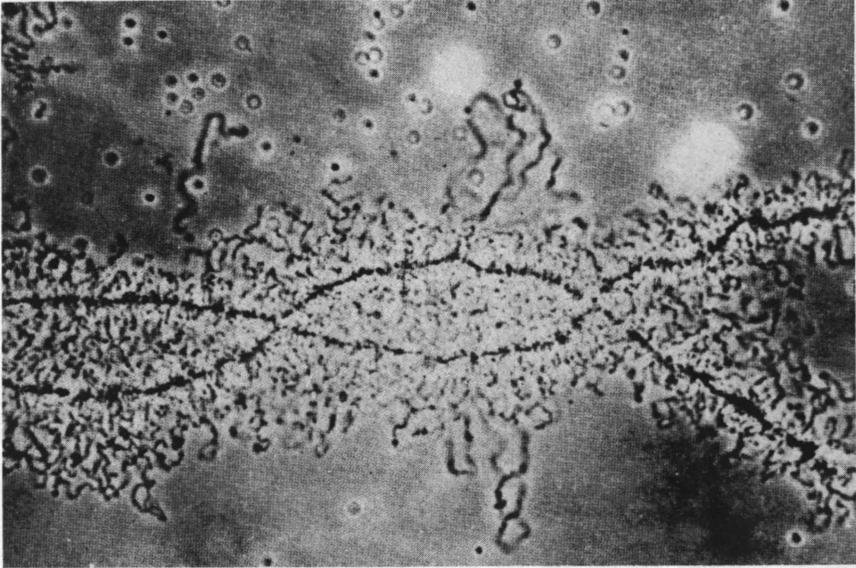


FIG. 7. – *Chromosomes plumeux* vus en contraste de phase, après dissection d'une vésicule germinative isolée à partir d'un oocyte de Triton. On remarque d'innombrables boucles qui se détachent des chromosomes ; ceux-ci se trouvent au stade diplotène de la méiose et sont unis par des *chiasmata*.

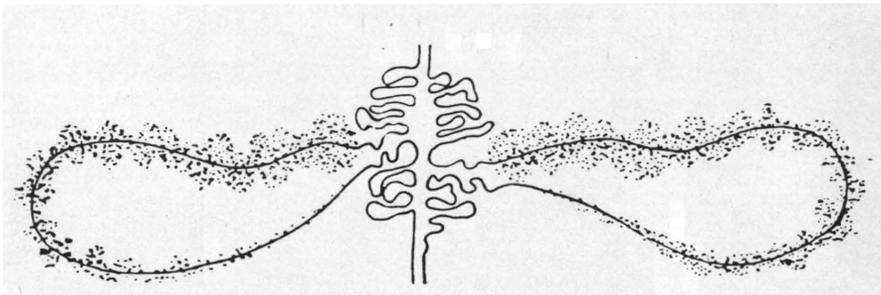
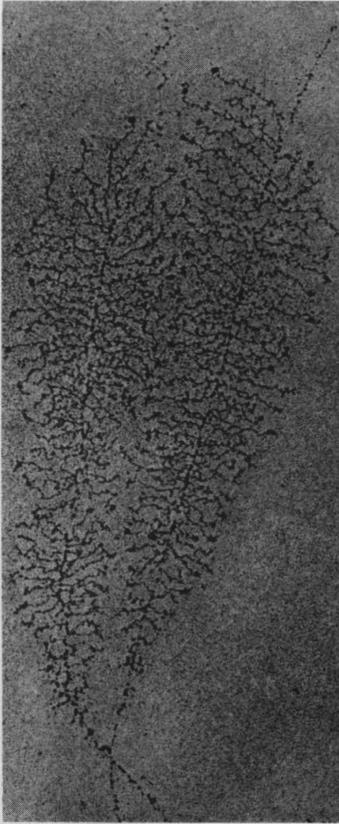
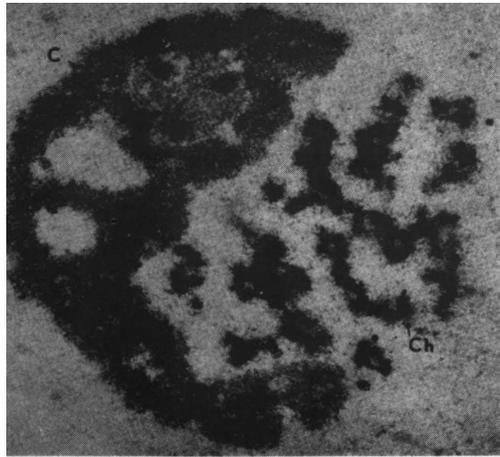
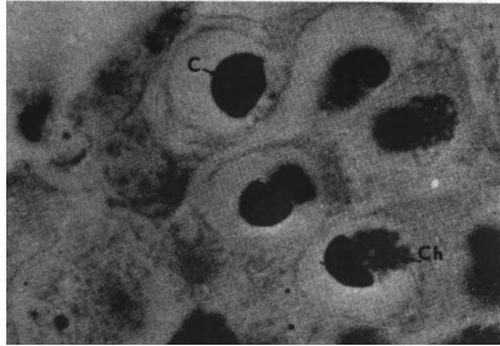


FIG. 8. – Représentation schématique d'un *chromomère* et de la paire de *boucles* attente. Le chromosome plumeux est constitué par une fibre continue d'ADN, qui se replie en zig-zag pour former le *chromomère* ; elle s'étend latéralement dans le suc nucléaire, pour former une boucle. La synthèse de l'ARN, qui est schématisée par des points en nombre variable, progresse de façon unidirectionnelle le long des boucles (d'après J. G. GALL).



9



10

FIG. 9. – Photographie au microscope électronique d'organiseurs nucléolaires isolés à partir des nucléoles d'oocytes des *Xénope*. On voit des chaînes du précurseur 45S des rARN en voie de croissance sur l'axe de rADN. Ces chaînes manquent aux extrémités supérieures et inférieures des fibres de rADN ; elles correspondent aux «espaceurs», où l'ADN n'est pas transcrit (photographie due à l'amabilité des Drs. O. L. MILLER et B. R. BEATTY).

FIG. 10. – Coupe de très jeunes oocytes de *Xénope*, au stade pachytène. En haut : vus au microscope photonique (A. FICQ). En bas : vus au microscope électronique (P. VAN GANSEN. C : coiffe contenant les gènes ribosomiaux (rADN) ; ch : chromosomes. Nu : nucléole faisant son apparition au sein de la coiffe.

appariés et unis par des «*complexes synaptinémaux*» en certains points. Ils sont formés de *chromomères* condensés d'où se projettent latéralement des *boucles*. La présence de DNA dans les chromomères a été établie par l'auteur de cet article dès 1929 ; les recherches ultérieures de H. G. Callan ont montré que l'axe des chromosomes plumeux est constitué par une fibre continue de DNA, mesurant plus de 50 cm. Elle se condense au niveau des chromomères comme le montre schématiquement la fig. 8 ; les boucles sont recouvertes de RNA et de protéines ; c'est à leur niveau que de nombreuses variétés de RNA sont synthétisées. La morphologie des chromosomes plumeux (qui se rencontrent dans les oocytes de toutes les espèces) a paru pendant longtemps singulière ; on tend de plus en plus aujourd'hui à penser que tous les chromosomes sont formés de boucles et de chromomères, mais peu visibles en raison de la condensation de la chromatine dans les cellules somatiques. Les oocytes de Xénope en voie de vitellogénèse se caractérisent en outre par la présence d'un millier de *nucléoles* riches en RNA, comme nous l'avons montré alors que les cellules somatiques n'en contiennent généralement que deux.

Comment les cellules-mères des oocytes, les *oogonies*, se transforment-elles en oocytes ? Ces cellules se divisent activement, puis entrent en méiose lorsqu'elles ont achevé une ultime phase S de réplication du DNA : la teneur en DNA du noyau est à ce moment «4C», c'est-à-dire 4 fois la teneur en DNA d'une cellule haploïde. Cette teneur en DNA ne change pas pendant toute l'oogénèse, qui ne comporte donc pas de synthèse de DNA chromosomal. C'est au cours des semaines qui suivent la métamorphose du têtard que se déroulent les stades initiaux (et classiques) de la méiose : on trouve, dans ces très jeunes ovaires, des oogonies et des oocytes aux stades leptotènes, zygotènes, pachytènes et jeunes diplotènes. Nous nous trouvons encore en période de *prévitellogénèse* où la taille des gonocytes reste modérée ; cette période a été décrite avec précision par P. Van Gansen (1974), qui a combiné heureusement la microscopie électronique et la microscopie photonique pour étudier le développement des nucléoles.

Le stade *pachytène* chez le Xénope doit retenir particulièrement l'attention : à ce moment, il est possible de séparer, par centrifugation deux fractions distinctes de DNA : outre le DNA global, présent dans toutes les cellules, on peut isoler un pic de *DNA satellite*, plus lourd parce qu'il est plus riche en guanine et cytosine (G-C) que le DNA majeur. Les recherches de Brown et Dawid, et celles de Gall ont permis

d'établir qu'il s'agit des gènes qui codent les RNA ribosomiaux. Ce *DNA ribosomal* (rDNA) existe en particulière abondance dans les jeunes oocytes de Xénope ; cet heureux concours de circonstances a permis d'isoler, pour la première fois, des gènes à l'état pur. A l'heure actuelle, nous connaissons parfaitement, grâce à D. Brown et ses collaborateurs, l'anatomie fine de ces gènes ; nous savons qu'ils sont organisés en tandem et séparés par des fibres de DNA non transcrit (spacers). Nous n'ignorons plus rien des processus complexes qui conduisent des gènes ribosomiaux aux produits finaux de leur transcription, les RNA ribosomiaux 28S et 18S du cytoplasme. Enfin, une technique élégante, due à O. Miller, permet de *voir* des gènes ribosomiaux en activité au microscope électronique (fig. 9) : les «sapins de Noël» correspondent à la synthèse des RNA précurseurs des RNA ribosomiaux ; ils sont dûs à la formation de chaînes ribonucléoprotéiques de plus en plus longues ; ces chaînes sont absentes au niveau des «spacers» qui séparent les «unités de transcription».

Comment se fait-il que l'oocyte de Xénope, au stade pachytène, contienne suffisamment de gènes ribosomiaux pour qu'il soit possible de les isoler par une technique simple de centrifugation ? C'est dû à l'existence d'un phénomène d'*amplification* sélective de ces gènes ; alors que le DNA global ne se réplique pas pendant l'oogénèse, le DNA ribosomal se réplique indépendamment du restant du génome par un mécanisme qui reste imparfaitement compris. Le résultat final est que, alors qu'une cellule somatique diploïde de Xénope possède 1000 gènes ribosomiaux, l'oocyte en contient 2.000.000 de copies.

L'amplification des gènes ribosomiaux a fait, à l'ULB, l'objet de belles recherches cytochimiques et autoradiographiques de A. Ficq (1968, 1970, 1977). Elle a pu établir que l'amplification du rDNA s'effectue pendant huit jours au moins au moment où la réplication du DNA a complètement cessé dans les chromosomes pachytènes. Elle a montré aussi que, dans les noyaux pachytènes, les chromosomes en bouquet sont surmontés d'une coiffe contenant le rDNA : cette coiffe (fig. 10) se distingue du DNA chromosomal par une affinité différente pour certains colorants basiques. L'emploi d'enzymes spécifiques lui a permis de démontrer que le rDNA présent dans la coiffe se trouve sous forme monocaténaire à l'inverse du DNA bicaténaire classique des chromosomes pachytènes. D'autres recherches effectuées à Rhode ont établi, grâce au microscope électronique, que les nucléoles font leur apparition au sein de la coiffe du rDNA amplifié (Van Gansen et

Schram, 1972, 1974). Ceci explique que la vésicule germinative de l'oocyte acquiert progressivement des centaines, puis un millier de nucléoles ; chacun de ceux-ci contient un (parfois plusieurs) *organismes nucléolaires* : ce sont des cercles de DNA ribosomal qui possèdent la structure désormais classique en «sapins de Noël».

A quoi pourrait bien servir l'amplification des gènes ribosomiaux au stade pachytène ? Evidemment à permettre une accumulation massive de ribosomes dans le cytoplasme de l'oocyte afin de lui permettre d'effectuer des synthèses protéiques intenses. En réalité, la réponse à la question doit être plus nuancée. Comme l'a montré notre collaborateur Christian Thomas dès 1970, les oocytes prévitellogéniques (c'est-à-dire les oocytes transparents dont la taille ne dépasse pas 0.2-0.3 mm de diamètre) ne synthétisent pas de RNA ribosomiaux de haut poids moléculaire (28S et 18S) ; ils ne synthétisent que des RNA de transfert (tRNA), des RNA messagers (mRNA) et du rRNA 5S. Dans l'oocyte prévitellogénique, les gènes ribosomiaux 28S et 18S sont déjà amplifiés 1.000 fois par rapport aux cellules somatiques ; mais paradoxalement, ils ne sont pas transcrits ; les raisons de cette répression de la transcription des gènes ribosomiaux dans les jeunes oocytes de Xénope demeurent mal connues. Quoiqu'il en soit, dès que la vitellogénèse débute, les gènes ribosomiaux amplifiés s'activent et la situation se renverse : à partir de ce moment, plus de 90 % des RNA synthétisés appartiennent à la classe des RNA ribosomiaux de haut poids moléculaire (28S et 18S). Finalement, l'oocyte en fin de croissance, possède jusqu'à 10^{12} ribosomes ! C'est manifestement beaucoup trop pour les besoins propres de l'oocyte : en effet, 90 % des ribosomes de l'œuf vierge de Xénope sont inactifs, «non programmés» ; ceci signifie qu'ils ne sont pas liés à des RNA messagers et de transfert sous la forme de polyribosomes et qu'ils ne sont donc pas engagés dans des synthèses protéiques.

Il est clair que l'oocyte – tel l'écureuil à l'approche de l'hiver – accumule des ribosomes en énorme excédent sur ses besoins. La chose est prouvée par l'existence d'une mutation particulièrement intéressante chez le Xénope ; c'est la mutation nu-o, qui est une délétion (perte) des organisateurs nucléolaires, donc des gènes ribosomiaux. Les œufs fécondés de ces mutants «anucléolés» ne forment pas de nucléoles et ils sont incapables de synthétiser les RNA ribosomiaux 28S et 18S, donc de nouveaux ribosomes ; néanmoins ils peuvent survivre et donner naissance à des têtards qui possèdent un système nerveux, des muscles,

du sang circulant, un intestin, etc. La mutation devient létale à ce stade ; mais elle démontre élégamment que le stock de ribosomes accumulé par l'oocyte est suffisant pour permettre le développement quasi normal de l'œuf fécondé pendant une semaine (Gurdon et Brown).

L'accumulation de ribosomes «non programmés» dans l'oocyte de Xénope a une conséquence importante : cet oocyte constitue un merveilleux «tube à essai» pour étudier la *traduction de messagers* exogènes. Les belles expériences de Gordon, Lane et Marbaix (1971) ont été les premières dans ce domaine : du mRNA codant l'hémoglobine de lapin a été injecté dans des oocytes de Xénope et on a pu suivre biochimiquement la synthèse de cette hémoglobine de mammifère dans un oocyte d'amphibien pendant plusieurs jours. Depuis le «système oocytes de Xénope» a été utilisé pour étudier la synthèse de très nombreuses protéines après injection des mRNA correspondants (cfr. l'article de H. Chantrenne) ; on a pu aussi, comme l'ont fait G. Huez et G. Marbaix à Rhode montrer par des expériences de ce type que la séquence monotone AAA ... (poly A) qui termine la plupart des mRNA sert à stabiliser leurs molécules dans le cytoplasme. Récemment, on a constaté que certaines des protéines synthétisées par l'oocyte sont excrétées dans le milieu extérieur et on a pu préciser le rôle que les membranes intracellulaires de l'oocyte jouent dans ce processus d'excrétion.

L'oogénèse du Xénope a réservé encore d'autres surprises. On sait depuis longtemps que les chromosomes plumeux synthétisent activement des RNA au niveau de leurs boucles. L'examen au microscope électronique de chromosomes plumeux étalés selon la méthode de O. Miller a établi qu'une même boucle peut synthétiser plusieurs RNA différents : à l'idée initiale que chaque chromomère correspond à un gène s'était substituée celle de l'équivalence entre une boucle et un gène ; ceci est manifestement faux, puisque plusieurs gènes différents peuvent être localisés sur une même boucle. On croyait aussi, jusqu'il y a peu, que les boucles des chromosomes plumeux synthétisent des messagers qui, après s'être liés à des protéines, sont stockés dans le cytoplasme. En effet, de même que l'oocyte accumule un gros excédent de ribosomes, il accumule aussi une population extrêmement importante de RNA messagers sous une forme «masquée», inactive : le cytoplasme de l'oocyte de Xénope (comme celui de l'œuf vierge d'oursin d'ailleurs) contient, selon E. Davidson et ses collaborateurs, environ 20.000 espèces différentes de messagers d'origine maternelle,

ils sont théoriquement capables de coder la synthèse d'autant de protéines. Mais une surprise nous attendait : des travaux récents ont montré, de manière convaincante, que cette énorme population de mRNA est synthétisée en *prévitellogénèse* ; bien que les chromosomes plumeux des oocytes vitellogéniques synthétisent des RNA variés pendant des mois, ils n'ajoutent rien au stock de mRNA déjà élaboré en prévitellogénèse. En d'autres termes, nous ignorons, pour le moment, la nature et le rôle biologique des RNA synthétisés en abondance pendant toute la vitellogénèse. Elucider ces points constitue un sujet de recherches passionnant et important pour l'avenir.

Comme on le voit, le début de la vitellogénèse constitue un virage dans la régulation de la synthèse des RNA : il coïncide avec l'éveil de la synthèse des RNA ribosomiaux de haut poids moléculaire et avec la cessation de la production des messagers. C'est à ce moment aussi que les mitochondries cessent de se multiplier. Nous ignorons si c'est la pénétration de la vitellogénine synthétisée par le foie de l'organisme maternel qui constitue pour l'oocyte le signal qui contrôle la synthèse de tel ou tel type de RNA. Par contre, nous connaissons bien, grâce surtout aux travaux de R. Wallace, le mécanisme de la pénétration de la vitellogénine dans l'oocyte de Xénope : cette phosphoprotéine se lie à des récepteurs situés sur la membrane de l'oocyte, le complexe vitellogénine-récepteur est endocyté et transformé de manière à donner naissance aux protéines finales de réserve (phosvitine et lipovitelline) qui s'accumulent, sous forme cristalline, dans les *plaquettes vitellines*. En fin d'oogénèse, le vitellus d'origine exogène constitue 90 % des protéines totales de l'œuf. Il est à noter que si la vitellogénine est très stable dans les plaquettes vitellines, elle est rapidement dégradée quand on l'injecte dans l'oocyte.

Les plaquettes vitellines de l'oocyte de Xénope ont fait l'objet de nombreuses recherches à Rhode. On y a montré, pour la première fois, que ces plaquettes contiennent de petites quantités de DNA. Ce *DNA vitellin* qui ressemble au DNA des cellules somatiques est probablement d'origine exogène : il dériverait des noyaux de cellules hépatiques et de globules rouges lysés au moment où la vitellogénine est synthétisée par le foie et lâchée dans le sang. Le rôle du DNA vitellin, comme celui des phosphoprotéines des plaquettes vitellines, serait celui d'un matériel de réserve utilisable par l'embryon pour la synthèse du DNA nucléaire (travaux de E. Baltus, F. Hanocq, J. Hanocq-Quertier, G. Steinert, M. Kirsch, J. Brachet). Il avait été suggéré par Dalcq, Pasteels, Mulnard et

nous-même que les plaquettes vitellines seraient une forme modifiée de lysosomes. Des expériences biochimiques de M. Decroly, M. Goldfinger et N. Six-Tondeur (1979) et des observations de cytochimie ultrastructurale (G. Steinert et J. Hanocq, 1979) indiquent que cette hypothèse n'est pas à retenir : il n'y a pas d'association, contrairement à ce que l'on pensait, entre les plaquettes vitellines et les enzymes lysosomiales ; celles-ci sont localisées dans des vésicules plus légères que le reticulum endoplasmique, peut-être de nature golgienne ou prélysosomiale.

La vitellogénèse coïncide avec l'établissement d'un net *gradient de polarité*, la taille et le nombre des plaquettes vitellines diminuent progressivement en allant du pôle *végétatif* (inférieur) au pôle animal (supérieur) de l'oocyte. La distribution des ribosomes suit un gradient inverse, décroissant du pôle animal au pôle végétatif. Comme nous l'avons vu, la perturbation de ce gradient de polarité par une centrifugation modérée des œufs fécondés conduit à la microcéphalie (J. Pasteels) : l'importance morphogénétique de ce gradient est donc considérable. On connaît encore mal les facteurs qui conditionnent l'apparition du gradient de polarité animale-végétative ; il semble probable qu'il résulte d'un flux ionique traversant l'oocyte d'un pôle à l'autre, ce qui produirait une migration des organites intracellulaires par cataphorèse.

Revenons un instant à la synthèse des RNA par la vésicule germinative. Elle nécessite la présence, en abondance, des enzymes de synthèse des RNA, les RNA polymérases I, II et III. Effectivement, les vésicules germinatives isolées d'oocytes de Xénope constituent une riche source de RNA polymérases, elles sont utilisées maintenant couramment pour réaliser la transcription *in vitro* de gènes isolés par clonage moléculaire. La RNA polymérase I (nucléolaire, spécialisée dans la synthèse des rRNA 28S et 18S) est beaucoup moins abondante dans les noyaux des oocytes en prévitellogénèse que dans ceux des oocytes en vitellogénèse ; ce serait l'une des raisons pour lesquelles les oocytes en prévitellogénèse synthétisent peu de rRNA de haut poids moléculaire (F. Hanocq, V. Heilporn et C. Thomas, 1980).

L'oocyte de Xénope, grâce à sa taille, se prête bien à l'*injection directe* de DNA (donc de gènes purifiés) dans la vésicule germinative. C'est ainsi que J. Gurdon et D. Brown ont obtenu la transcription fidèle du gène codant le rRNA 5S, puis celle des gènes ribosomiaux 28S et 18S. D'autres gènes, transcrits cette fois par la RNA polymérase II, ont

été introduits depuis dans la vésicule germinative des oocytes de Xénope. Citons notamment les intéressants travaux de M. Birnstiel sur les gènes codant les histones des œufs d'oursin : ces gènes peuvent être manipulés à volonté, *in vitro*, par l'expérimentateur qui réalise ainsi les mutations dirigées avant d'injecter le gène modifié dans la vésicule germinative de l'oocyte. L'injection du gène modifié *in vitro* dans la vésicule germinative permet d'apprécier les conséquences des manipulations génétiques réalisées au choix de l'expérimentateur. Ces techniques ont permis à Birnstiel et à d'autres de découvrir beaucoup de choses importantes et nouvelles sur le contrôle de l'activité génétique.

Enfin, l'oocyte de Xénope se prête fort bien aussi à l'étude de la *structure et de la perméabilité de la membrane nucléaire*. La structure de la membrane nucléaire est la même chez toutes les cellules nucléées ; comme l'ont montré des études de microscopie électronique effectuées en premier lieu sur des membranes nucléaires isolées à partir d'oocytes de Xénope, cette membrane est percée de *pores* octogonaux dont la dimension est un peu inférieure à $0.1 \mu\text{m}$. Le pore est partiellement obturé par un granule central et il est renforcé par des granules latéraux qui prennent appui sur la double membrane nucléaire.

Un problème important est évidemment celui de la *perméabilité* des pores de la membrane nucléaire qui doit assurer les échanges entre le noyau et le cytoplasme. Le nombre total des pores passe de 10 à 40 millions lorsque le diamètre de l'oocyte de Xénope passe de 300 à $1.200 \mu\text{m}$ pendant la vitellogénèse ; à ce moment, il passe 2.6 molécules de RNA ribosomiaux par minute du noyau vers le cytoplasme : comme leur poids moléculaire peut dépasser un million de daltons, il est difficile d'expliquer les choses en faisant appel à une perméabilité banale. Peut-être les pores nucléaires sont-ils des structures dynamiques qui s'ouvrent ou se ferment pour arrêter ou laisser passer les RNA synthétisés dans le noyau et en transit vers le cytoplasme.

Nous sommes mieux renseignés en ce qui concerne le transit, en sens inverse, des *protéines* synthétisées dans le cytoplasme. Dès 1972, A. Ficq a démontré, par autoradiographie, que les protéines néosynthétisées migrent du cytoplasme vers le noyau, où elles peuvent s'accumuler. Plus récemment, divers chercheurs (J. Gurdon, E. De Robertis, C. Feldharr, W. Franke, etc.) ont repris ces recherches avec des méthodes biochimiques raffinées. Leurs expériences montrent que certaines protéines ont une localisation strictement cytoplasmique ; d'autres tendent à se concentrer fortement dans le noyau après injection

dans le cytoplasme (protéines «caryophiles»); quelques unes se distribuent également entre le noyau et le cytoplasme. D'une manière générale, les protéines du suc nucléaire, après injection dans le cytoplasme, retournent rapidement dans le noyau ; au contraire, les protéines cytoplasmiques restent dans le cytoplasme. Des recherches similaires, effectuées sur des amibes, ont montré l'existence de protéines (et même de RNA de faible poids moléculaire) qui font continuellement la navette entre le noyau et le cytoplasme. Il n'existe aucune corrélation entre la pénétration d'une protéine dans le noyau et son poids moléculaire ou sa charge électrique ; il a même été montré récemment que les protéines caryophiles s'accumulent dans la vésicule germinative même si sa membrane nucléaire a été percée au moyen d'une fine aiguille. Il n'existe donc pas de perméabilité sélective de la membrane nucléaire et il est vraisemblable que l'accumulation de certaines protéines dans le noyau, après injection intracytoplasmique est due à la présence dans le suc nucléaire, de sites de liaison comparables aux récepteurs des hormones.

Parmi les protéines caryophiles, il convient de signaler la *nucléoplasmine* qui représente plus de 10 % des protéines du suc nucléaire ; son rôle est de permettre au DNA de se combiner aux *histones* (protéines basiques) qui sont abondantes aussi dans le suc nucléaire de l'oocyte de Xénope. Le résultat de cette interaction, qui se produit dans toutes les cellules, est que la fibre nue de DNA s'enroule autour d'un octamère d'histones avec la formation de «*nucléosomes*» : il en résulte que la *chromatine* (DNA chromosomal associé aux histones et à d'autres protéines) possède une structure plus compacte que le DNA.

On voit que l'oocyte de Xénope a joué (et joue encore) un rôle considérable dans le développement de nombreux aspects de la Biologie cellulaire et moléculaire : son intérêt dépasse largement le cadre strictement embryologique.

5. LA MATURATION MÉOPTIQUE DE L'OOCYTE DE XÉNOPE (1)

La maturation est la transformation de l'oocyte en un œuf vierge fécondable. Chez les Amphibiens, les cellules folliculeuses qui entourent l'oocyte sécrètent, en réponse à une stimulation par des

(1) Pour plus de détails, voir le rapport quinquennal d'activité présenté par E. Baltus, J. Hanocq-Quertier et J. Brachet au Ministère de la Politique Scientifique en 1981.

hormones hypophysaires, de la *progestérone*. Cette hormone stéroïde provoque, en quelques heures, une véritable révolution dans l'oocyte : la vésicule germinative gonfle et migre vers le pôle animal ; sa membrane nucléaire se rompt du côté basal ; simultanément, les chromosomes plumeux se condensent et les nucléoles disparaissent à l'exception des organisateurs nucléolaires dont le rDNA est encore décelable pendant la segmentation. Les chromosomes, qui se sont condensés au maximum se rassemblent sur les fibres constitutives d'un fuseau. Ce *fuseau de maturation* migre dans le cortex du pôle animal où se produit l'expulsion du 1^{er} *globule polaire* ; il contient la moitié des chromosomes et très peu de cytoplasme. Les chromosomes restés dans l'oocyte s'assemblent sur un second fuseau de maturation. Les choses en restent là chez les amphibiens : le 2^e globule polaire ne sera éliminé que quand l'œuf sera fécondé ou activé par piqûre : à ce moment, l'œuf vierge est devenu une cellule haploïde.

La morphologie de la maturation a été étudiée, au point de vue de l'ultrastructure, par P. Van Gansen dans un travail désormais classique. Une étude cytochimique des oocytes d'amphibiens en maturation nous a permis de montrer pour la première fois, il y a plus de 40 ans, que les nucléoles contiennent du DNA : en effet, lors de la désintégration des nucléoles, leurs organisateurs nucléolaires se condensent en granules décelables par les techniques cytochimiques qui permettent de déceler le DNA (réaction de Feulgen). Plus récemment, G. Steinert a montré, par hybridation moléculaire *in situ* au niveau ultrastructural, que les granules Feulgen-positifs que nous avons observés sont effectivement constitués de rDNA. Tout comme les chromosomes, les organisateurs nucléolaires ne répliquent pas leur DNA pendant la maturation (C. Thomas et collaborateurs). La chose est curieuse, car Gurdon a montré que si on injecte des noyaux de cellules somatiques ou même des préparations de DNA d'origines diverses dans des oocytes de Xénope, il y a répllication du DNA à condition que la maturation ait été induite par l'addition de progestérone. Dans des expériences encore inédites avec E. Hubert, nous avons étudié les conséquences de l'injection de noyaux de jeunes oocytes prévitellogéniques dans de gros oocytes traités à la progestérone : ces noyaux, comme la vésicule germinative des gros oocytes, gonflent et leur membrane nucléaire se rompt ; les chromosomes se condensent, mais, à l'inverse de ceux des gros oocytes, ils se répliquent à plusieurs reprises. En fait, toute la machinerie enzymatique requise pour la répllication du DNA s'édifie pendant la

maturation ; mais les chromosomes et les organisateurs nucléolaires de l'oocyte en maturation sont protégés contre cette machinerie ; celle-ci ne servira la réplication du DNA chromosomal qu'après la fécondation de l'œuf, pendant la segmentation.

Si on isole, par dissection, de gros oocytes de Xénope et si on les traite *in vitro* par de la progestérone, ils accomplissent leur maturation en 6 à 10 h. Pendant les 3 ou 4 premières heures, la maturation peut être bloquée par l'addition d'inhibiteurs de la synthèse des protéines ou de la production d'énergie ; les événements ultérieurs, qui conduisent à la rupture de la vésicule germinative (GVBD, pour «*germinal vesicle breakdown*») ne nécessitent ni énergie, ni synthèse protéique, comme nous l'avons montré avec A. Pays. En réalité, un métabolisme quasi normal est nécessaire pour que l'oocyte synthétise ou active un «*facteur de maturation*» responsable de la rupture de la membrane nucléaire et de la condensation des chromosomes : c'est le MPF (*maturation promoting factor*) de Masui et Markert. Ce facteur peut être décelé en injectant du cytoplasme d'un oocyte traité par la progestérone (jusqu'à la GVBD) dans un oocyte neuf, receveur : ce cytoplasme induit en 1 à 2 h. la maturation dans un oocyte receveur qui n'a jamais «vu» la progestérone. On peut répéter des transferts du cytoplasme de façon répétée avec le même succès : les premières molécules de MPF, formées ou activées par le traitement à la progestérone, sont donc douées de propriétés autocatalytiques et il se produit une *amplification* du facteur. Le MPF n'a encore été purifié que de façon incomplète ; il semble que son site d'action, au point de vue moléculaire, soit la phosphorylation de certaines protéines. Le MPF n'est plus décelable dans les œufs vierges, mais il réapparaît, de façon cyclique, pendant la segmentation de l'œuf fécondé au moment où la membrane nucléaire disparaît et où les chromosomes se condensent. Des recherches récentes de Sunkara et Rao ont montré que le MPF (dont l'activité est testée par injection dans des oocytes de Xénope) est présent aussi dans les cellules somatiques où il ne devient décelable qu'au moment où elles entrent en mitose. Il s'agit donc d'un facteur très répandu, dont le rôle est la dissolution de la membrane nucléaire et la condensation des chromosomes mitotiques. Son mécanisme d'action est malheureusement encore inconnu.

E. Baltus et J. Hanocq-Quertier ont montré qu'il apparaît, dans l'oocyte, traité par la progestérone, un facteur qui exerce, à l'inverse du MPF, un effet négatif sur la maturation : c'est le *facteur de*

pseudomaturation dont l'injection provoque une maturation anormale et rapidement abortive ; la toxicité de ce facteur est probablement liée au fait qu'il inhibe massivement la synthèse des protéines dans l'oocyte injecté.

Enfin, Masui a mis en évidence l'apparition d'un troisième facteur après traitement des oocytes de Xénope par la progestérone ; c'est le *facteur cyostatique (CSF)*, qui apparaît plus tardivement que le MPF. Si on injecte du cytoplasme prélevé à un œuf vierge de Xénope dans l'un des deux premiers blastomères d'un œuf de Xénope en voie de clivage, l'activité mitotique s'arrête dans le blastomère injecté : la figure mitotique se bloque en métaphase ; il est donc probable que le rôle physiologique du CSF est d'arrêter la maturation en métaphase de la deuxième division méiotique.

Récemment, nous avons eu la curiosité de rechercher si des oocytes non mûrs, encore en voie de vitellogénèse (diamètre de 0.7-0.9 mm), sont capables de répondre à une injection de MPF, à un stade où la progestérone est incapable d'induire leur entrée en maturation (J. Hanocq-Quertier et collab.) : l'injection de MPF provoque la rupture de la membrane nucléaire et la condensation des chromosomes, mais le fuseau de maturation ne s'édifie pas. On peut toutefois induire la polymérisation des microtubules, dans ces jeunes oocytes injectés de MPF, en les traitant par divers agents (eau lourde, protéines basiques, analogues du GTP, etc.) qui favorisent la polymérisation *in vitro* de la tubuline. Si les chromosomes condensés et dispersés des petits oocytes injectés de MPF sont transférés dans le cytoplasme d'un gros oocyte traité par la progestérone, ils peuvent se répliquer et former un fuseau : ces chromosomes sont donc incapables d'organiser la tubuline en un fuseau lorsqu'ils sont dans leur propre cytoplasme ; mais ils le font lorsqu'ils ont été transférés dans le cytoplasme d'un oocyte receveur adulte en voie de maturation.

Le mode d'action de la progestérone sur l'oocyte de Xénope est encore loin d'être complètement élucidé. On admet généralement qu'elle agit à la surface de l'oocyte sans pénétrer dans celui-ci ; en effet, des dérivés des hormones stéroïdes qui sont incapables de pénétrer dans les cellules peuvent induire la maturation ; en outre, la progestérone est inefficace si on l'injecte dans les oocytes. Toutefois, Ozon et ses collaborateurs viennent de montrer que l'injection de progestérone en solution huileuse provoque la maturation. Il est douteux qu'il existe un récepteur spécifique de la progestérone, d'autant plus que d'autres

hormones stéroïdes (à l'exception des oestrogènes) sont tout aussi efficaces que la progestérone pour induire la maturation des oocytes de Xénope. On voit que le mode d'action de la progestérone, quel qu'il soit, est fort différent du mécanisme classique d'action de cette hormone sur les tissus-cibles des endocrinologistes (liaison de l'hormone à un récepteur cytoplasmique, migration du complexe hormone-récepteur modifié dans le noyau, dérèglement d'un petit nombre de gènes conduisant à une synthèse massive des quelques protéines correspondantes).

Ce fut par hasard que nous découvrîmes en 1975, que les *organomercuriels* qui réagissent avec les groupes -SH de la membrane cellulaire sans pénétrer à l'intérieur des cellules induisent la maturation des oocytes de Xénope aussi efficacement que la progestérone. Plus tard, il fut montré que de nombreuses substances, qui n'ont rien de commun avec les stéroïdes, induisent la maturation de ces oocytes : c'est le cas, notamment du chlorure de lanthane, du propranolol, de la miansérine, etc. Tous ces agents induisent la *libération d'ions calcium* liés à la membrane, comme l'ont souligné Baulieu et ses collaborateurs en 1978. En outre, l'injection de Ca^{++} dans la membrane de l'oocyte provoque la maturation. Enfin, on a montré récemment que l'addition de progestérone aux oocytes de Xénope provoque, en un temps très court (30 secondes) une libération d'ions calcium. Notons cependant que, comme nous l'avons montré, le calcium n'est pas le seul ion qui joue un rôle dans la maturation : les ions magnésium sont souvent plus efficaces que le Ca^{++} pour induire la maturation ; celle-ci est favorisée si on diminue la teneur en ions potassium du milieu ou celle de l'oocyte lui-même.

Quoiqu'il en soit, il est clair que la progestérone – qui est le stimulus naturel de la maturation – provoque des événements biochimiques *précoces* dans l'oocyte : l'un d'entre eux est la libération rapide et transitoire de Ca^{++} dont nous venons de parler. Un autre, mis en évidence par Maller et collab. (1979) est une chute brusque et profonde (près de 50 % en moins d'une minute) de la teneur en *AMP cyclique* (cAMP) ; cette chute est transitoire et, au moment de la rupture de la vésicule germinative, la teneur en cAMP est redevenue normale. La chute rapide initiale de la teneur en cAMP est due à ce que la progestérone inhibe l'enzyme qui synthétise ce nucléotide cyclique comme on l'a montré récemment dans plusieurs laboratoires ; selon Baltus, Hanocq-Quertier et Guyaux (1981), la progestérone inhibe de

60% l'activité de l'enzyme en 2 minutes ; cette activité redevient normale en moins de 30 minutes. L'hormone n'affecte pas l'activité de l'enzyme qui dégrade le cAMP, la cAMP phosphodiesterase.

Le cAMP, qui a été beaucoup étudié dans le laboratoire du Professeur R. Kram, intervient dans de nombreux processus biologiques ; son rôle est d'activer des *protéinekinases* ; ces enzymes phosphorylent diverses protéines, ce qui peut modifier profondément leur conformation et leur activité. La chute initiale de la teneur en cAMP provoquée par la progestérone doit avoir pour conséquence de diminuer l'activité de ces «cAMP dépendantes» protéinekinases dans l'oocyte ; ceci conduirait à la déphosphorylation de certaines protéines. On pense aujourd'hui, sans en avoir la preuve formelle, que l'oocyte de Xénope posséderait une protéine phosphorylée dont la présence s'opposerait à l'entrée en maturation ; celle-ci devient possible dès que cette protéine a été déphosphorylée par une phosphoprotéinephosphatase (enzyme dont nous avons montré la présence, dans les oocytes d'amphibiens, il y a de longues années).

A côté de ces changements biochimiques précoces, induits par la progestérone, il s'en produit d'autres plus *tardivement* : la *respiration* de l'oocyte augmente progressivement après addition de progestérone, comme nous l'avons montré. Il en va de même pour la *synthèse des protéines* qui quadruple en 8 heures. Bien que la question demeure controversée, il semble bien qu'il apparaisse, pendant cette période, quelques protéines nouvelles, qui n'étaient pas synthétisées par l'oocyte non stimulé ; c'est le cas notamment pour les enzymes et les facteurs d'activation de la synthèse du DNA. La synthèse de certaines histones (mais pas de toutes) est stimulée beaucoup plus fortement que celle des protéines globales. Il ne s'agit donc pas d'une réponse indiscriminée à la stimulation hormonale : la synthèse d'un nombre limité de protéines est fortement stimulée de façon sélective.

Peu avant la rupture de la vésicule germinative, il se produit une vague de *phosphorylation des protéines* ; elle coïncide avec l'apparition du MPF et elle est absolument requise pour la réalisation de la maturation. De nombreuses protéines sont phosphorylées à ce moment ; l'une d'entre elles, comme l'ont montré, très récemment, J. Hanocq-Quertier et E. Baltus (1981), est l'une des protéines des ribosomes, la *protéine ribosomale S6*. Le rôle de la phosphorylation de la protéine S6 dans la synthèse des protéines n'est pas encore bien établi ; mais on sait que cette protéine est phosphorylée chaque fois que

des cellules sont soumises à des stimuli mitogénétiques. Il se pourrait que la modification par phosphorylation de leur protéine S6 permette aux ribosomes de sélectionner préférentiellement certains messagers : ceci expliquerait la synthèse sélective de certaines protéines dans les oocytes stimulés par la progestérone ; mais ceci n'est, pour le moment, qu'une hypothèse attrayante.

L'oogénèse est, nous l'avons vu, contrôlée par l'*activité de la vésicule germinative* ; en va-t-il encore de même pendant la maturation ? Pendant les heures qui précèdent sa rupture, la vésicule germinative continue à synthétiser des RNA, mais ceux-ci ne servent pas à la maturation elle-même, car on peut supprimer leur synthèse au moyen d'inhibiteurs spécifiques sans entraver la maturation. L'un des avantages des oocytes d'amphibiens est la facilité des expériences d'*énucléation* : c'est ce qui nous a permis de montrer, dès 1939, que la respiration du noyau est négligeable par rapport à celle du cytoplasme ; cette conclusion éliminait définitivement la théorie de Jacques Loeb, qui avait proposé que le noyau serait le centre des oxydations cellulaires. Ce fut néanmoins une surprise lorsqu'on montra surtout dans le laboratoire de L. D. Smith, que les principaux événements biochimiques qui se produisent après l'addition de progestérone se déroulent aussi dans des oocytes qui ont été préalablement *énucléés* : ceux-ci présentent la même stimulation de la synthèse des protéines (avec une synthèse préférentielle d'histones), la même vague de phosphorylations, la même production de MPF que les oocytes intacts traités à la progestérone. Les changements ultrastructuraux du cortex qui se produisent lors de la maturation et de l'activation par piqûre dans les oocytes normaux se retrouvent, absolument identiques, dans les oocytes énucléés au préalable.

Est-ce à dire que la vésicule germinative ne joue aucun rôle pendant la maturation, que le mélange du suc nucléaire avec le cytoplasme ne modifie pas celui-ci ? Non, comme le montrent de nombreuses expériences. Si on injecte, par exemple, des spermatozoïdes dans un oocyte de Xénope traité par la progestérone, leurs noyaux gonflent et deviennent capables de synthétiser des acides nucléiques ; ce gonflement, qui est dû à l'entrée de certaines protéines de l'oocyte dans les noyaux spermatiques injectés, ne se produit pas si l'oocyte a été énucléé avant de lui ajouter de la progestérone. L'injection de suc nucléaire provenant d'une vésicule germinative dans l'oocyte énucléé restaure la capacité d'activer les noyaux des spermatozoïdes injectés. Voici un

autre type d'expériences : l'addition d'eau lourde ou de taxol, l'injection de centrosomes d'appareils mitotiques ou de flagelles sont suivies de la formation d'asters dans les oocytes en maturation ; il ne se forme des asters ni dans les oocytes non stimulés par l'hormone, ni dans les oocytes énucléées avant l'addition de celui-ci. Le mélange du suc nucléaire, peut-être modifié sous l'action de la progestérone, avec le cytoplasme de l'oocyte est donc indispensable pour que les microtubules puissent être organisés en asters. Il faut en conclure que, à côté de la maturation nucléaire si frappante lorsqu'on l'observe sous le microscope, il existe une *maturation cytoplasmique*, plus subtile et que l'expérimentation seule permet de révéler.

Nous allons quitter les oocytes et les œufs de Xénope, qui nous ont appris tant de choses curieuses, pour les œufs d'oursin ; nous les retrouverons plus loin, lorsque nous nous intéresserons à la segmentation. Mais avant de terminer ce chapitre, il importe de souligner que tout ce qui vient d'être dit à propos de l'oocyte de Xénope est vrai, à des détails près, pour les oocytes d'espèces aussi éloignées que l'étoile de mer, la truite ou la souris ; bien que les hormones qui y induisent la maturation puissent être différentes de la progestérone, la séquence des événements biochimiques est la même : libération de Ca^{++} , diminution transitoire du cAMP, onde de phosphorylation de protéines, synthèse de quelques protéines nouvelles, production de MPF. Celui-ci n'a pas de spécificité d'espèce : l'injection de MPF de Xénope dans un oocyte d'étoile de mer induit sa maturation. Voilà un bel exemple de «l'unité du vivant». Dans tous les cas étudiés, la synthèse des protéines pendant la maturation est contrôlée au niveau de la traduction des mRNA accumulés dans le cytoplasme au cours de l'oogénèse. Nous allons voir qu'il en va de même lors de la fécondation.

6. LA FÉCONDATION DE L'ŒUF VIERGE

C'est la fécondation (ou la parthénogénèse) qui va tirer l'œuf vierge de son inertie tant au point de vue du développement que de la synthèse des macromolécules (DNA, RNA et protéines). C'est pourquoi la première réaction au spermatozoïde fécondant ou à un stimulus parthénogénétique (piqûre chez les œufs d'amphibiens, traitement par l'eau de mer hypertonique ou l'acide butyrique, chez l'oursin) est appelée *réaction d'activation* ; on la nomme aussi réaction corticale

parce qu'elle conduit au soulèvement d'une *membrane de fécondation* (cfr fig. 3) aux dépens de constituants du cortex ovulaire. La membrane de fécondation résulte de la rupture de granules riches en glycoprotéines situés immédiatement sous la membrane plasmique de l'œuf ; le contenu de ces *granules corticaux* est exocyté, c'est-à-dire déversé dans le milieu extérieur ; là, les glycoprotéines des granules corticaux précipitent, se polymérisent et prennent finalement une forme cristalline. La rupture des granules corticaux et l'exocytose de leur contenu sont induits par une augmentation locale de la teneur en ions Ca^{++} du cortex de l'œuf.

La fécondation entraîne de nombreux *changements biophysiques et biochimiques* qui ont surtout été étudiés chez l'oursin où ils sont particulièrement rapides et intenses. Au point de vue biophysique, on observe surtout des variations du potentiel de membrane qui vont de pair avec une augmentation de la pénétration d'ions K^+ . Une première variation, extrêmement rapide, du potentiel de membrane semble bien être responsable du «bloc rapide à la polyspermie» : seul le spermatozoïde qui a touché l'œuf en premier lieu et qui a induit un changement quasi immédiat du potentiel de membrane pénétrera dans l'œuf et réalisera l'amphimixie. La membrane de fécondation, qui se soulève en une minute chez l'oursin (en 1 heure chez les œufs beaucoup plus volumineux des amphibiens) constitue un second obstacle à la pénétration de spermatozoïdes surnuméraires (*bloc lent à la polyspermie*).

On sait, depuis les travaux de O. Warburg au début de notre siècle, que la fécondation provoque, chez l'oursin, une augmentation massive (300 à 500 %) et rapide (en 5 min.) de la respiration. Toutefois, ce phénomène n'est pas universel : la fécondation des œufs des vers et des mollusques, celle de l'œuf de grenouille, n'est pas suivie d'une augmentation rapide de la respiration ; celle-ci diminue même lorsque l'œuf du polychète *Chaetopterus* est fécondé ou activé par l'addition d'un excès de KCl.

La nature du substrat oxydé au moment où la respiration de l'œuf d'oursin augmente brutalement est demeurée mystérieuse pendant de longues années ; ce n'est que tout récemment qu'on a démontré que ce substrat est tout simplement de ... l'eau (H_2O) qui est transformée en eau oxygénée (H_2O_2) celle-ci est décomposée par une enzyme présente dans les granules corticaux et est utilisée pour durcir la membrane de fécondation.

Il y a une cinquantaine d'années, J. Runnström a montré qu'il se forme, à la fécondation de l'œuf d'oursin, un *acide* qui diffuse dans l'eau de mer ; réagissant avec les bicarbonates de l'eau de mer, il provoque la production d'une «bouffée de CO_2 ». On a consacré des années de recherches à tenter d'identifier «l'acide de fécondation». Ici encore, une surprise nous attendait : il s'agit en réalité, d'une extrusion de protons (H^+) compensée par l'entrée d'ions sodium (Na^+) ; la fécondation n'est pas possible dans de l'eau de mer artificielle dépourvue de NaCl . Le résultat de cet échange H^+/Na^+ est une élévation du *pH intracellulaire* d'environ 0.3 unités de pH. Cette alcalinisation du cytoplasme a, comme nous allons le voir, d'importantes conséquences.

Parmi les divers processus biochimiques que nous venons de passer en revue, deux sont universels : une libération de Ca^{++} stocké dans des vésicules cytoplasmiques et l'alcalinisation du cytoplasme. La libération de Ca^{++} est indispensable à la réaction corticale : un moyen tout à fait général d'induire cette réaction est de traiter des œufs vierges de n'importe quelle espèce par un ionophore des ions calcium qui fait pénétrer dans l'œuf les ions Ca^{++} présents dans le milieu ambiant. La réalité d'une libération de Ca^{++} à la fécondation a été démontrée chez de nombreux Invertébrés marins, des poissons, des amphibiens, etc.

Il existe toutefois un autre moyen d'activer parthénogénétiquement les œufs d'oursin, découvert il y a une dizaine d'années par D. Mazia : il consiste à traiter les œufs par de l'ammoniaque ce qui augmente le pH intracellulaire. Dans ce cas, il n'y a pas de réaction corticale, donc pas de soulèvement d'une membrane de fécondation ; mais les chromosomes de l'œuf se répliquent et il se forme des asters comme dans les œufs fécondés.

Chez toutes les espèces, la fécondation (ou l'activation parthénogénétique) est très rapidement suivie d'une synthèse de DNA : en général, chacun des deux pronuclei double sa teneur en DNA en quelques minutes avant même sa fusion lors de l'amphimixie. La réplication du DNA se produit simultanément dans tous les noyaux spermatiques et dans le pronucleus femelle en cas de polyspermie : il est donc clair que le démarrage de la synthèse du DNA doit se trouver sous le contrôle du cytoplasme de l'œuf, comme l'a montré jadis Albert Brachet. L'étude des œufs activés à l'ammoniaque a montré que la synthèse du DNA dans l'œuf fécondé n'est pas contrôlée par la libération initiale d'ions Ca^{++} et qu'elle résulte (selon un mécanisme encore inconnu) de l'alcalinisation du cytoplasme de l'œuf.

La fécondation provoque aussi une augmentation de la *synthèse des protéines*, particulièrement marquée chez l'oursin où elle a été découverte en 1960, par A. Monroy : la stimulation des *synthèses protéiques* y est particulièrement forte et rapide.

La première explication qui est venue à l'esprit pour expliquer cette brusque synthèse de protéines est celle d'une *synthèse de mRNA* par les deux pronuclei. Nous avons pu exclure cette hypothèse par des expériences (effectuées à Naples avec l'aide de divers chercheurs de Rhode), sur des *fragments nucléés et anucléés* d'œufs d'oursin. Si, comme l'a fait E. B. Harvey vers 1935, on centrifuge à grande vitesse des œufs vierges d'oursin suspendus dans un gradient de densité, les œufs finissent par se séparer en deux moitiés : une moitié légère qui possède le noyau et une moitié lourde anucléée. Les deux types de fragments peuvent être fécondés ou activés parthénogénétiquement ; dans le premier cas, les deux sortes de fragments peuvent former des embryons ; dans le second, seuls les fragments nucléés peuvent donner naissance à des larves. Par contre, les fragments anucléés soumis à des traitements parthénogénétiques ne peuvent que former des asters et se diviser de façon anarchique. Jamais ces fragments ne sont capables d'éclore et de former des cils, comme le font les blastulas d'oursin normales.

Nos expériences ont montré que si on traite des fragments *anucléés* par un agent parthénogénétique simple (de l'eau de mer hypertonique), on stimule la synthèse des protéines aussi intensément que dans un œuf normal fécondé ; cette augmentation de la synthèse des protéines est due à la formation, en l'absence du noyau, de polyribosomes fonctionnels. Les conclusions de ces expériences étaient claires : l'œuf vierge doit contenir, sous une forme *masquée*, inactive, des mRNA qui ont été synthétisés au cours de l'oogénèse : la fécondation (ou l'activation) démasquerait ces messagers, leur permettant de se lier aux ribosomes et d'être traduits. Ces conclusions sont désormais acceptées par tous ; des recherches ultérieures d'auteurs américains ont montré que l'œuf vierge d'oursin contient les messagers spécifiques de la tubuline et des histones ; tous les messagers maternels sont localisés dans des particules ribonucléoprotéiques plus petites que les ribosomes ; ils y sont inactifs aussi longtemps qu'ils sont liés aux protéines constitutives de ces particules. Il y a d'excellentes raisons de penser que le «démasquage» des mRNA maternels est une conséquence de l'augmentation du pH intracellulaire lors de la fécondation et de

l'activation. Rappelons enfin que, selon E. Davidson et ses collaborateurs, la population des mRNA maternels accumulés sous forme inactive pendant l'oogénèse de l'oursin ou du Xénope s'élève à 20.000 espèces différentes. Pour le moment, nous nous efforçons, en collaboration avec G. Steinert, de déceler la localisation intracellulaire de ces messagers maternels par cytochimie ultrastructurale.

Ajoutons qu'il est fort possible que d'autres facteurs que ceux qui viennent d'être discutés interviennent dans la régulation de la synthèse des protéines lors de la fécondation de l'œuf d'oursin : on a notamment incriminé les ribosomes qui seraient anormaux dans les œufs vierges. La question n'est pas encore vidée à l'heure actuelle ; mais il est intéressant de noter que la fécondation et l'activation parthénogénétique induisent la phosphorylation de la protéine ribosomiale S6 dont nous avons parlé à propos de la maturation ; cette modification des ribosomes pourrait peut-être faciliter leur liaison aux mRNA maternels.

Signalons enfin que le cas de l'œuf d'oursin reste exceptionnel : la stimulation des synthèses protéiques à la fécondation est modérée chez les œufs de divers mollusques et vers, ainsi que chez la grenouille. Chez le Chétopère, Zampetti-Bosseler a même observé un arrêt momentané des synthèses protéiques pendant l'heure qui suit la fécondation ou l'activation ; cet arrêt va de pair avec la baisse de la respiration qui se produit à ce moment, comme nous l'avons vu. En réalité, ces différences quantitatives tiennent plus à l'état physiologique des *œufs vierges* qu'à une stimulation par le spermatozoïde : chez l'oursin, l'œuf vierge est réprimé au maximum ; chez les autres espèces, la synthèse des protéines de l'œuf vierge est à peu près normale ; peut-être est-elle excessive chez le Chétopère. En d'autres termes, la fécondation *régularise* la respiration et la synthèse des protéines qui étaient anormalement basses chez l'œuf vierge d'oursin, hautes chez celui du Chétopère.

7. LA SEGMENTATION ⁽¹⁾

Comme nous l'avons déjà vu, la segmentation de l'œuf fournit un bel exemple de l'unité et de la diversité du vivant : dans tous les cas, il se

⁽¹⁾ Pour plus de détails, voir les rapports de R. Tencer, de H. Alexandre et de J. Brachet au Ministère de la Politique de la Recherche.

produit une réplication généralement rapide, intensive et répétée du DNA, suivie de divisions cellulaires : l'activité mitotique toujours intense pendant la segmentation conduit à la cellularisation du germe. C'est ce qui nous a permis, en 1933, de montrer, pour la première fois, qu'il se produit une importante synthèse de DNA pendant la segmentation de l'œuf d'oursin ; à ce moment, beaucoup d'embryologistes croyaient que du DNA qui se serait accumulé dans le cytoplasme pendant l'oogénèse migrerait dans les noyaux au cours de la segmentation. En réalité, cette théorie de la «migration» était erronée et J. Loeb avait raison lorsqu'il affirmait qu'il se produit, pendant la segmentation, une synthèse nette de DNA. Mais, on décrit plusieurs types de segmentation différents, conditionnés surtout par l'abondance et la localisation du vitellus, la formation ou non d'une cavité de segmentation (blastocèle). Rappelons encore que la segmentation, en subdivisant l'œuf par le truchement des *sillons de segmentation*, conduit, chez les œufs en mosaïque, à la ségrégation de *plasmés* qui donneront naissance aux divers organes de la larve et de l'adulte : ce sont les *localisations germinales* des anciens embryologistes que l'on tend à appeler maintenant les «déterminants cytoplasmiques». L'un d'entre eux est le *croissant gris* des œufs d'amphibiens, qui marque le futur côté dorsal de l'embryon comme l'ont montré jadis W. Roux et Albert Brachet ; nous lui avons consacré une longue revue. Le premier sillon de segmentation coupe généralement le croissant gris en deux parties égales et il correspond donc au *plan de symétrie bilatérale* de l'embryon, puis de l'adulte. Le croissant gris, comme les autres localisations germinales est un territoire strictement cytoplasmique ; sa destruction par piqûre ou irradiation conduit à la formation d'embryons où les organes axiaux (système nerveux, chorde) sont fortement déficients. L'expérimentateur peut déterminer à volonté la position du croissant gris par des procédés simples.

Un autre matériel favorable pour étudier les localisations germinales est l'œuf des Tuniciers : peu après la fécondation, on assiste à la ségrégation de divers plasmés, reconnaissables au microscope, qui donneront naissance aux divers organes de la larve (muscles, système nerveux, etc.).

Rappelons enfin que la segmentation est le stade idéal pour étudier la *régulation embryonnaire* découverte par H. Driesch au début de ce siècle : il a constaté que si on sépare les deux premiers blastomères d'un œuf d'oursin, chacun peut donner naissance à un embryon complet.

Cette découverte que «la partie peut donner le tout» a conduit Driesch à développer une philosophie néovitaliste. La régulation serait due à l'*entéléchie*, principe immatériel n'existant ni dans l'espace, ni dans le temps inaccessible à l'expérimentation ! On ne sera pas surpris si des embryologistes moléculaires, surtout s'ils sont libre-exaministes, s'intéressent peu à l'entéléchie.

Par contre, tous les embryologistes s'intéressent beaucoup au problème suivant : l'existence de déterminants cytoplasmiques, liés à l'hétérogénéité du cytoplasme, est admise par tous ; mais existe-t-il aussi une *hétérogénéité des noyaux*, qui pourrait expliquer la différenciation embryonnaire ? Des expériences de ligature d'œufs de Batraciens et d'Insectes ont clairement démontré que les noyaux sont identiques (équipotentiels) pendant la segmentation : un échange de noyaux entre un blastomère dorsal et un blastomère ventral n'affecte en rien le développement. Mais il se pourrait que, par la suite, les noyaux se différencient, comme l'avait proposé T. H. Morgan en 1930. Les remarquables expériences de *transplantations nucléaires* de Briggs et King, puis de Gurdon ont tenté de résoudre le problème : ces expériences consistent dans l'énucléation d'un œuf vierge de grenouille ou de Xénope suivie de l'injection d'un noyau prélevé à un stade plus ou moins avancé de l'embryogénèse. Les résultats ne sont malheureusement pas aussi clairs qu'on le voudrait : tout le monde est d'accord sur le fait que tous les noyaux de la blastula sont identiques et totipotents, c'est-à-dire capables d'assurer un développement complet (jusqu'à l'adulte). Mais Briggs et King, travaillant sur la grenouille, ont observé une diminution des potentialités morphogénétiques des noyaux dès le stade gastrula alors que Gurdon a montré que, chez le Xénope, l'injection du noyau d'une cellule *adulte*, hautement différenciée dans un œuf vierge énucléé peut donner naissance à un têtard. L'interprétation de ces expériences demeure délicate, car on ne peut pas exclure, croyons-nous, la possibilité d'un «rajeunissement» du noyau d'une cellule adulte lorsqu'on le force à se répliquer dans un cytoplasme très jeune. Néanmoins, il est certain que les noyaux d'une blastula ne constituent pas une mosaïque de noyaux génétiquement différents ; et il est probable que certains noyaux de l'adulte sont encore totipotents, génétiquement identiques à celui de l'œuf fécondé.

Nous ne parlerons pas ici de l'*activité mitotique* si caractéristique de la segmentation chez tous les œufs ; rappelons seulement que l'œuf d'oursin nous a beaucoup appris au sujet de la réplication du DNA et

de l'édification de l'appareil mitotique. Il nous a aussi fait connaître un fait curieux : les histones (protéines basiques associées au DNA) changent pendant la segmentation de l'œuf d'oursin ; à des histones maternelles succèdent des histones «de clivage», qui sont elles-mêmes remplacées, au stade blastula, par des histones «embryonnaires». Ces changements impliquent l'activation, puis l'inactivation, des batteries de gènes codant les divers types d'histones.

Nous nous limiterons ici à quelques questions qui ont été étudiées dans les laboratoires de Rhode. Une première question est la suivante : une différenciation embryologique ou cytologique quelconque est-elle possible en l'absence de clivage ? En 1906, Lillie a montré que l'œuf de Chétopère (un Polychète) est capable d'une *différenciation sans clivage*. On peut obtenir une larve trochophore typique du Chétopère d'une part et, une larve *unicellulaire ciliée* après un traitement parthénogénétique d'autre part. Il existe une similitude manifeste entre les deux larves, mais il y a aussi des différences : la larve unicellulaire ciliée est dépourvue de «*touffe ciliaire apicale*» et d'intestin. Nous avons beaucoup étudié la différenciation sans clivage chez le Chétopère, avec l'aide de S. Denis-Donini, B. De Petrocellis, A. Ficq et H. Alexandre et nous avons abouti aux conclusions générales suivantes : la première étape est un *pseudo-clivage* ; on a l'illusion que l'œuf va se diviser normalement mais le sillon qui sépare les blastomères s'efface immédiatement. Comme nous l'avons montré, dès 1937-1938, il se produit à ce moment une répllication intensive des chromosomes et du DNA. L'échec du clivage, comme l'avait vu J. Pasteels dès 1935 est dû au fait que dans les œufs parthénogénétiques, il ne se forme qu'un seul aster : le pseudo-clivage résulte d'une succession de *cycles monastériens*. Après cette période initiale, l'œuf manifeste une *activité amiboïde* exceptionnelle : sa forme change continuellement et même de petits fragments anuclées de l'œuf sont le siège de contractions intenses. Le résultat final de cette activité amiboïde désordonnée est une *ségrégation* entre le vitellus et le cytoplasme hyalin, riche en ribosomes. A ce moment, l'œuf possède un seul noyau, hautement polyploïde ; il s'en échappe une myriade de chromosomes, qui se répartissent au hasard dans une couronne de noyaux-fils. Dans une partie de la population, la ségrégation s'opère d'une manière harmonieuse : un ectoplasme clair entoure un endoplasme riche en vitellus, ce qui rappelle l'ectoderme et l'endoderme d'une gastrula. Ces «pseudo-gastrulas» peuvent éclore et se couvrir de cils, qui leur permettent de se déplacer ou de tourner

rapidement sur elles-mêmes comme des toupies. L'observateur peut entretenir l'illusion d'assister à l'étonnante transformation d'une amibe en un Protozoaire cilié !

Nos expériences, que nous ne pouvons détailler ici, ont montré que la *réplication du DNA*, au cours des cycles monastériens caractéristiques de la période initiale de pseudoclivage, a une importance cruciale pour la suite du développement : l'arrêt de ces cycles par des inhibiteurs de l'assemblage des monasters (la colchicine) ou de la synthèse du DNA chromosomal (l'aphidicoline) empêche complètement la différenciation sans clivage. Curieusement, l'arrêt de la réplication du DNA n'affecte pas le pseudoclivage lui-même : la formation de sillons éphémères est donc indépendante de la multiplication des chromosomes. Si les œufs où la synthèse du DNA a été bloquée pendant la phase de pseudoclivage ne donnent jamais naissance à des larves ciliées, il n'en va pas de même plus tard : si l'arrêt de la synthèse du DNA a lieu 4 à 5 h après le début de l'expérience, (c'est-à-dire à la fin du pseudoclivage) on obtient autant de larves ciliées que chez les témoins.

Ces expériences montrent clairement que la synthèse initiale du DNA pendant la période de pseudoclivage (plus exactement pendant les 5 premiers cycles monastériens) est plus importante pour la différenciation sans clivage que celle qui se produit de façon plus tardive : tout se passe comme si le 5^e cycle de réplication des chromosomes avait une signification critique. Nous verrons bientôt que l'œuf de Chétoptère n'est pas une exception à cet égard ; pour le moment retenons qu'il est possible d'obtenir des larves unicellulaires ciliées dont la teneur en DNA a été réduite de plus de 50 % : ce n'est donc pas la quantité absolue de DNA qui détermine l'éclosion et la ciliation des larves unicellulaires mais l'éclosion et la ciliation nécessitent, par contre, des synthèses de RNA et de protéines.

Passons maintenant aux recherches de R. Tencer sur les *interactions entre les cellules* au cours de la morphogénèse chez les amphibiens. Ces interactions sont d'une importance primordiale : par exemple, si on isole la partie animale d'une blastula de Xénope, elle forme uniquement de l'ectoderme ; si on l'associe à des cellules endodermiques de la partie végétative, certaines cellules ectodermiques sont transformées en mésoderme (Nieuwkoop). Si, comme l'a fait R. Tencer, on désagrège un jeune embryon de Batracien et reporte ensuite les cellules dissociées dans un milieu normal, elles se réagrègent en manifestant des *affinités* sélectives selon leur origine ectodermique, mésodermique ou endoder-

mique : l'adhésion sélective entre des cellules qui se reconnaissent comme membres d'une même famille joue un rôle capital dans les mouvements morphogénétiques de la gastrulation et l'induction du système nerveux.

R. Tencer a étudié de près la fixation, par la membrane cellulaire, de *lectines* ; ce sont des protéines ou glycoprotéines d'origine végétale, qui se fixent sur des résidus sucrés spécifiques portés par la membrane cellulaire. Ses observations ont démontré que l'organisation moléculaire de cette membrane change entre la morula et la gastrula, donc au cours de la segmentation. En outre, elle a montré que le traitement d'un œuf d'amphibien par une lectine (la WGA, qui «reconnait» l'acétylglucosamine) inhibe la formation du sillon de segmentation qui est due à la contraction d'un anneau de microfilaments. Il faut en conclure que ces microfilaments contractiles sont en rapport étroit avec la membrane plasmique et qu'ils se contractent en réponse à un signal reçu au niveau de cette membrane ; la fixation de la lectine au niveau des résidus acétylglucosamine de la membrane a pour conséquence la désorganisation de l'anneau contractile de microfilaments. Les lectines, comme les inhibiteurs directs des microfilaments (les cytochalasines) affectent aussi la locomotion des cellules embryonnaires dissociées. Les interactions entre la membrane cellulaire et le cytosquelette de microfilaments contractiles qui lui est associé continuent à jouer un rôle important lors de la gastrulation et de la neurulation : certaines lectines bloquent, en effet, les mouvements morphogénétiques qui conduisent à la gastrula, puis à la neurula.

Nous venons de voir que la «pseudogastrulation» et la formation ultérieure de larves unicellulaires ciliées chez le Chétopère ne nécessitent pas de synthèse de DNA, mais que ces processus morphogénétiques sont impossibles si on a bloqué la réplication du DNA à un stade plus précoce (le pseudoclivage). Des expériences que nous avons effectuées récemment sur l'œuf d'oursin nous ont montré qu'il en va *grosso modo* de même pour un inhibiteur spécifique (l'aphidicoline) à divers stades du développement et les résultats obtenus peuvent être résumés en quelques mots. Il n'y a ni éclosion, ni ciliation (comme chez le Chétopère) si on traite de jeunes blastulas par l'aphidicoline ; la gastrulation est partielle après traitement de blastulas avancées ; elle est complète et le traitement débute au stade jeune gastrula. En d'autres termes, la réplication du DNA et l'augmentation du nombre des cellules sont indispensables pour que la gastrulation

s'amorce ; elles ne sont pas nécessaires une fois que cette phase de préparation à la gastrulation a pris fin. A ce moment, ce sont les déformations des cellules, leur migration, leur contraction qui, comme dans les expériences de R. Tencer, jouent le rôle prépondérant.

On sait que la segmentation est le stade de choix pour l'étude des localisations germinales. Un matériel particulièrement favorable à cet égard est l'œuf de souris, qui a été beaucoup étudié à Bruxelles par A. Dalcq puis J. Mulnard et H. Alexandre. Cet œuf a l'avantage de pouvoir être cultivé *in vitro* depuis le stade 2 blastomères jusqu'à la blastula (appelée blastocyste chez les Mammifères). Le blastocyste est formé de deux parties distinctes : le *trophectoderme* qui sert à l'accrochage à l'utérus de la mère et l'*amas embryogène* formé de quelques cellules qui donneront naissance à tout l'embryon, puis à l'adulte. Il est possible chez la souris, de fusionner deux jeunes morulas ; elles forment un seul blastocyste qui, réimplanté dans l'utérus d'une femelle pseudo-gestante, donne naissance à une souris «tétraparentale» (A. Tarkowski) ; si les deux morulas étaient génétiquement différentes, la souris tétraparentale est dite allopathique (B. Mintz). C'est à J. Mulnard que l'on doit la première démonstration irréfutable en 1965, de ce que l'œuf de souris est un œuf à *régulation* : chacun des deux premiers blastomères séparés au stade 2 cellules est capable de donner finalement naissance à un souriceau. Un accident semblable, survenu pendant la segmentation est à l'origine des jumeaux identiques chez l'homme.

Au stade 8 blastomères, l'œuf subit un changement découvert par J. Mulnard en 1967 : c'est la *compaction*, effacement des sillons qui séparaient les blastomères, ce qui rend impossible le dénombrement précis des cellules. A ce moment, comme l'ont montré J. Mulnard et un groupe de chercheurs à Cambridge, les cellules sont polarisées : les propriétés de leurs membranes et de leur cytoplasme sont différentes sur leurs faces externe et interne. Il en résulte qu'au stade 16 blastomères, il existe deux populations cellulaires (externes et internes) distinctes : l'œuf de souris, après la compaction, devient un œuf en mosaïque alors qu'il était un œuf à *régulation* auparavant. Si on inhibe la compaction, chaque cellule se creuse d'une vacuole ; dans ce cas, ces vacuoles ne confluent pas pour former un blastocèle unique (le lécithocèle) qui, en se dilatant, donnera naissance au blastocyste. Une étude encore en cours au microscope électronique, de la formation du lécithocèle indique qu'il n'aît d'un nombre restreint de blastomères (3

ou 4 sur 32, par exemple); d'abord intracellulaire (*cavitation*), il deviendrait extracellulaire à la suite d'une exocytose géante (H. Alexandre, J. Mulnard et M. Geuskens). Le lécithocèle apparaît dans des embryons dissociés aux stades 2, 4 ou 8 blastomères, bien qu'ils possèdent 2, 4 ou 8 fois moins de cellules que les embryons intacts correspondants : le déclenchement de sa formation ne dépend donc pas du nombre de cellules en présence.

A quoi la formation de lécithocèle pourrait-elle être due ? C'est ce que H. Alexandre s'efforce d'élucider en traitant des œufs de souris cultivés *in vitro* par des agents variés (rayons X, inhibiteurs de la synthèse du DNA et des polyamines, etc.). Ces expériences ainsi que celles d'auteurs anglais ont montré que la cavitation est induite après 5 cycles de divisions cellulaires. Les recherches de H. Alexandre ont établi, en outre, que l'œuf de souris contient, dès le stade 4 cellules, un important arsenal enzymatique destiné à assurer la réplication du DNA ; la présence d'un stock suffisant de polyamines est nécessaire aussi pour que la segmentation puisse se dérouler (il en va d'ailleurs de même pour l'œuf d'oursin, comme nous l'avons montré récemment). L'emploi d'un inhibiteur de la synthèse des polyamines, le MGBG a permis à H. Alexandre de montrer que, si le développement est arrêté après 2 cycles cellulaires, on obtient des morulas de 6 à 10 cellules, où la compaction est normale mais n'est jamais suivie de cavitation. Des expériences de réversibilité lui ont permis d'établir que la cavitation peut se réaliser normalement dans les embryons diploïdes et entiers où la majorité des blastomères n'ont pas terminé leur 5^e division ; mais une analyse plus poussée a montré que les cellules dont la division a été retardée ont répliqué leur DNA et que toutes les cellules ont donc parcouru 5 cycles de réplication du DNA. Cette conclusion a été renforcée par une étude des effets de l'aphidicoline (qui inhibe spécifiquement, comme nous l'avons vu, la synthèse du DNA) sur des œufs de souris cultivés *in vitro* (Alexandre, 1982) : elle a permis de conclure que, contrairement à la cavitation, la compaction est un phénomène programmé dans le temps et indépendant du nombre de cycles cellulaires préalables. L'initiation de la cavitation ne dépend ni du rapport nucléocytoplasmique, ni du nombre de cycles réplcatifs qui se sont déroulés, ni du nombre des cellules ; mais un minimum de cycles de réplication du DNA (comme chez le Chétoptère) est requis pour que la cavitation puisse démarrer. C'est à une conclusion identique qu'aboutissent des auteurs japonais qui ont montré que, dans

l'œuf des Ascidies, un nombre minimum de cycles de réplication du DNA est nécessaire pour que les localisations germinales deviennent actives (c'est-à-dire synthétisent les enzymes spécifiques caractéristiques de l'organe auquel elles donneront naissance) ; par exemple, l'acétylcholinestérase, caractéristique des muscles, n'apparaît dans le «myoplasme» de l'œuf qu'après 5 cycles de réplication du DNA.

Nous ignorons pourquoi un certain nombre de cycles de réplication du DNA est requis pour que la différenciation ultérieure soit possible, tant chez l'ascidie que le Chétopète et la souris. Peut-être se produit-il à ce moment ce que H. Holtzer a appelé une «mitose quantale», une mitose qui donnerait naissance à deux cellules différentes l'une de l'autre : l'une d'entre elles resterait indifférenciée, l'autre serait programmée («committed») pour se différencier dans une voie donnée. Peut-être les cycles de réplication du DNA constituent-ils une sorte d'horloge biologique qui indique le moment où les processus de différenciation embryonnaire doivent engager les cellules dans une voie généralement irréversible. A l'heure actuelle, nous en sommes réduits aux hypothèses ; discuter davantage ici le gigantesque et mystérieux problème de la différenciation embryonnaire nous entraînerait beaucoup trop loin.

8. LES INTERACTIONS NUCLÉOCYTOPLASMIQUES PENDANT LA MORPHOGÉNÈSE

C'est avec stupéfaction que l'auteur de ces lignes – alors jeune étudiant en Médecine – apprit, lors de la première leçon du cours de Cytyologie de Pol Gérard, que le cytoplasme anucléé ne meurt pas immédiatement : en effet, si on coupe en deux un œuf ou un organisme unicellulaire (expériences de *mérotomie*) le fragment anucléé survit et reste actif plus ou moins longtemps : par exemple, ce fragment conserve sa locomotion grâce à des mouvements amiboïdes ou au battement de cils pendant plusieurs heures. Pour cet étudiant naïf, la mérotomie aurait dû avoir les mêmes conséquences que la décapitation. C'est ce qui l'engage à travailler sur les acides nucléiques dans le laboratoire d'Albert Dalcq. Il reçut un jour la pénible mission de résumer un travail particulièrement long, écrit dans un allemand difficile, de J. Hämmerling : il y montrait que des fragments anucléés de l'algue unicellulaire *Acetabularia* sont non seulement capables de survivre pendant des mois, mais même de régénérer. Sans *Acetabularia* et Hämmerling, ces lignes ne seraient pas écrites dans une petite maison

très proche de la Méditerranée où, malgré la pollution, cette algue fascinante n'a pas encore disparu.

Acetabularia mediterranea est une algue unicellulaire dont la longueur atteint plusieurs cm. La fig. 11 montre son cycle biologique ⁽¹⁾ : des gamètes ciliés se fusionnent pour donner un zygote diploïde, qui grandit en formant une tige et un rhizoïde qui contient l'unique noyau. Lorsque l'algue a atteint sa taille maximale, elle forme, à son extrémité apicale, une ombrelle ou *chapeau* qui servira à la reproduction sexuée et qui possède une morphologie caractéristique selon l'espèce d'*Acetabularia* à laquelle l'algue appartient. C'est seulement quand le chapeau a atteint, à son tour, sa taille maximale que le noyau, jusqu'alors unique donne naissance à des noyaux-fils ; ils se multiplient et colonisent le chapeau, puis le divisent en logettes (les *cystes*) où se formeront des gamètes mobiles.

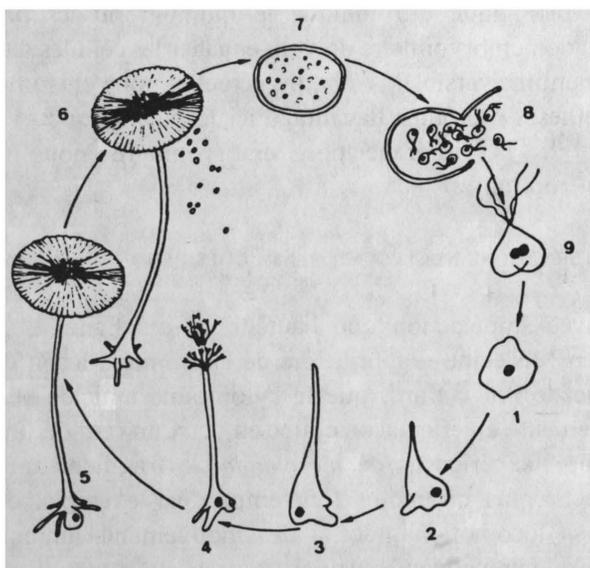


FIG. 11.

Les remarquables expériences de J. Hämmerling (1934) ont montré, nous l'avons vu, qu'un fragment *anuclée* de l'algue est capable de former un chapeau parfaitement normal, typique de l'espèce d'*acetabu-*

⁽¹⁾ Voir pour plus de détails, le rapport quinquennal d'activité de T. Vanden Driessche au Ministère de la Politique de la Recherche Scientifique.

laria étudiée ; des expériences de greffes interspécifiques ont démontré que les «substances morphogénétiques» qui dirigent la formation du chapeau sont d'origine nucléaire. Ces substances morphogénétiques, comme le montre la fig. 12. sont distribuées en gradient ; bien qu'elles soient produites par les noyaux, on constate que, de façon paradoxale, c'est l'extrémité opposée apicale, qui en contient le plus : les substances morphogénétiques sont donc distribuées selon un gradient décroissant dans le sens apico-basal. Ajoutons encore que le chapeau se forme et grandit plus vite dans un fragment anucléé que dans une algue intacte : ceci montre que le noyau peut exercer des contrôles *négatifs* sur le cytoplasme.

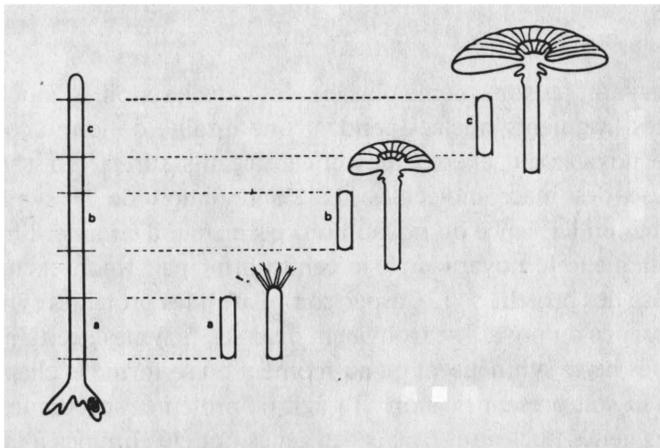


FIG. 12. – Distribution en gradient des «substances morphogénétiques» chez *Acetabularia*. C'est le fragment apical *c* qui régénère le mieux, bien qu'il soit le plus éloigné du noyau qui est logé dans le rhizoïde. Le fragment (*a*), bien qu'il soit proche du noyau, ne régénère pratiquement pas. Le fragment moyen (*b*) régénère mieux que (*a*) et moins bien que (*c*) (d'après les expériences de J. HÄMMERLING).

C'est vers 1955 que nous avons commencé, avec un groupe de collaborateurs (dont H. Chantrenne), à nous intéresser à la *biochimie* des fragments nucléés et anucléés d'*Acetabularia*. Cette étude devait nous réserver diverses surprises : non seulement la respiration et la photosynthèse demeurent intactes pendant des semaines dans les fragments anucléés, mais même la synthèse des macromolécules se poursuit pendant 2 à 3 semaines à un rythme intensif (fig. 13).

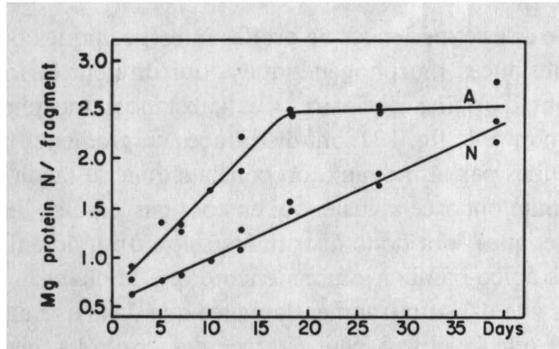


FIG. 13. – Protein synthesis in nucleate and anucleate halves of *Acetabularia* under optimal conditions (Brachet *et al.*, 1955).

Les synthèses sont même plus élevées dans les moitiés anucléées que dans les fragments nucléés pendant une dizaine de jours, confirmant que le noyau peut exercer des effets négatifs sur la croissance et la synthèse des macromolécules. La continuation de la synthèse des protéines en l'absence du noyau nous permettait d'éliminer l'hypothèse selon laquelle le noyau serait le centre principal, sinon exclusif de la synthèse des protéines (T. Caspersson). Parmi les protéines synthétisées en l'absence du noyau, se trouvaient diverses enzymes ; certaines de ces enzymes ne se synthétisent qu'au moment où se forme le chapeau, que le noyau soit présent ou non. Il s'agit de protéines spécifiques, codées par des gènes nucléaires ; mais des gènes ont été éliminés à la suite de l'ablation du noyau ! D'autres expériences, basées sur l'emploi de divers inhibiteurs, nous ont conduit à la conclusion que ces enzymes doivent être synthétisées sur des RNA produits par les gènes nucléaires et accumulés sous forme stable dans le cytoplasme ; quelques semaines plus tard, F. Jacob et J. Monod présentaient leur célèbre hypothèse des RNA messagers, à vie très brève chez les bactéries. Actuellement, tout le monde admet que, comme nous l'avons proposé il y a 20 ans, les substances morphogénétiques de Hämmerling sont une *famille de mRNA stables*. Plus récemment, H. G. Schweiger a montré que le noyau d'*Acetabularia* synthétise effectivement des mRNA qui passent dans le cytoplasme et migrent vers l'extrémité apicale où ils s'accumulent. La «demi-vie» de ces messagers est la même que celle des substances morphogénétiques que nous avons estimée à une dizaine de jours.

Mais l'existence d'une synthèse nette de RNA et surtout de DNA dans les fragments anucléés de l'algue était totalement imprévue et, à première vue, inexplicable. La seule explication possible était que les *chloroplastes* contiendraient du DNA et qu'ils seraient capables de se multiplier en l'absence du noyau ; c'est ce que nous avons pu montrer en collaboration avec E. Baltus et D. Shephard. En outre, nous avons établi, avec A. Goffeau, que les chloroplastes isolés d'*Acetabularia* sont capables de synthétiser *in vitro* des protéines. Plus tard, l'analyse biochimique de greffes entre des fragments nucléés et anucléés appartenant à des espèces différentes d'*Acetabularia* a permis à H. G. Schweiger et ses collaborateurs de conclure que les chloroplastes jouissent d'un large degré d'autonomie vis-à-vis du noyau ; mais que cette autonomie n'est pas complète et que le noyau contrôle à plus ou moins long terme, la composition en protéines des chloroplastes.

L'è gros noyau végétatif d'*Acetabularia* contient peu de DNA, mais il possède de nombreux nucléoles riches en RNA ; des recherches récentes dans les laboratoires de W. Franke et H. G. Schweiger ont montré que, dans le noyau d'*Acetabularia*, le DNA est associé à des nucléoles sont amplifiés. Rien ne semble aussi différent, à première vue, qu'une *Acetabularia* et un oocyte de Xénope ; et pourtant il existe une ressemblance étonnante entre le noyau de l'algue et celui de l'oocyte. Nouvel exemple de l'unité et de la diversité du vivant !

Nous avons vu que les fragments anucléés d'œufs d'oursin, bien qu'ils soient capables de synthétiser de nombreuses protéines et qu'ils contiennent de très nombreuses (peut-être 20.000) variétés de mRNA sont incapables de morphogénèse véritable ; il en va de même pour les œufs énucléés d'Amphibiens qui, comme ceux des oursins, atteignent au mieux un stade de blastula d'ailleurs anarchique. Les raisons pour lesquelles les capacités morphogénétiques des fragments anucléés d'*Acetabularia* sont tellement supérieures à celles des fragments anucléés d'œufs d'oursin ou d'Amphibiens nous échappent. Peut-être les étonnantes capacités morphogénétiques de moitiés anucléées d'*Acetabularia* résultent-elles d'une coopération entre les génomes chloroplastique et nucléaire, encore que les effets d'inhibiteurs spécifiques démontrent clairement que seuls les gènes nucléaires jouent un rôle décisif dans la morphogénèse. Une autre possibilité, qui n'a pas été explorée jusqu'à présent, serait que la stabilité des mRNA stockés dans le cytoplasme diffère dans les deux cas : nous savons que ces mRNA «survivent» plus de 15 jours dans un fragment anucléé

d'*Acetabularia*, mais nous ignorons tout de leur stabilité dans une moitié anucléée d'œuf d'oursin ou dans un œuf d'Amphibien énucléé. C'est un point que nous aimerions pouvoir éclaircir, afin de satisfaire enfin la curiosité éveillée, en 1927, par la première leçon de Pol Gérard. Quoiqu'il en soit, il est étonnant qu'un fragment d'un œuf qui possède 20.000 messagers différents (la «préformation» des philosophes de la Nature du XVIII^e siècle) soit incapable de réaliser autre chose qu'un clivage rapidement abortif ; ce paradoxe demande une explication en termes moléculaires.

9. UN VIEUX RÊVE SE RÉALISE !

Un rêve des biologistes, depuis toujours, a été de créer de nouvelles races où on aurait introduit, de façon héréditairement stable, un gène déterminé qui s'exprimerait de génération en génération. L'induction de mutations par irradiation ou par traitement par des agents chimiques mutagènes ne répond pas à ce désir : les mutations induites se produisent au hasard et elles ne peuvent pas être *dirigées* à volonté par l'expérimentateur.

Récemment, divers chercheurs américains (Gordon, Ruddle, Wagner, Mintz) sont parvenus à réaliser de façon convaincante des expériences qui avaient été tentées, dans notre laboratoire, par L. Ledoux qui fut un pionnier dans ce domaine : il s'agit de l'injection d'un gène purifié (Ledoux ne pouvait disposer que de DNA non purifié) dans l'un des pronuclei d'un œuf fécondé de souris. Les gènes utilisés sont ceux de diverses enzymes, de l'interféron et surtout de la β -globine de lapin dont on dispose, grâce au génie génétique, en abondance et à l'état pur. Après injection du gène de la β -globine dans l'un des pronuclei d'un œuf fécondé de souris, culture *in vitro* et implantation de cet œuf dans une souris pseudogravide, on a obtenu des souriceaux qui possèdent le gène étranger dans toutes leurs cellules y compris leurs cellules germinales. En les croisant, on a obtenu des descendants qui synthétisent de la β -globine de lapin ; la transmission héréditaire s'effectue selon les classiques lois de Mendel. Ces *souris «transgéniques»* réalisent le vieux rêve de diriger les mutations et de modifier à volonté l'Hérédité.

Un résultat similaire a été obtenu par B. Mintz en utilisant une approche différente. Elle a beaucoup étudié les tératocarcinomes de la souris, tumeurs d'origine ovarienne ou testiculaire qui contiennent

deux types de cellules : des cellules indifférenciées et malignes (dites cellules d'embryocarcinome) et des cellules qui donnent naissance à un embryon monstrueux, se différenciant dans toutes les directions possibles. En 1975, Mintz et Illmensee ont découvert un fait remarquable : si on implante un petit nombre de cellules malignes (qui tuent les souris si elles leur sont injectées) dans un blastocyste de souris, elles perdent leur malignité et elles participent, de façon tout à fait normale, à l'embryogénèse. Il est désormais possible d'introduire, dans ces cellules malignes d'embryocarcinome, des gènes purifiés avant de les planter dans un blastocyste : cela permet d'obtenir des adultes possédant le gène que l'on a introduit dans les cellules ; ces adultes transmettent le gène à leurs descendants, ce qui donne naissance à de nouvelles souches où les changements génétiques sont *prédéterminés*, c'est-à-dire qu'ils ont été décidés par l'expérimentateur.

On voit que l'Embryologie est à la veille de connaître un nouvel essor ; nous pensons qu'elle apportera des contributions d'une importance fondamentale à la solution des graves problèmes du cancer, des maladies héréditaires, du vieillissement. Un vieil embryologiste ne peut que se réjouir de ce renouveau. Mais il ne peut s'empêcher de souhaiter que, si on se met un jour à manipuler des œufs humains afin d'obtenir des hommes «transgéniques», ce soit toujours pour le bien et jamais pour le mal de l'humanité. Les «bébés en éprouvette» de la grande presse sont une réalité qui démontre que ce qui est réalisable sur l'œuf de souris l'est aussi sur celui de la femme ; le contraire eût étonné un embryologiste. Un jour viendra très probablement où un chercheur audacieux injectera un gène purifié dans l'un des deux pronuclei d'un œuf humain ; il le fera avec le secret espoir de parvenir à réaliser une thérapie génétique d'une affection congénitale, une hémoglobino-pathie par exemple. Cet apprenti sorcier nous fait un peu peur parce que des manipulations génétiques sur l'œuf humain risquent de faire renaître un racisme dont les conséquences tragiques ne sont pas encore oubliées.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes plus chaleureux remerciements à toutes celles et tous ceux qui m'ont apporté leur aide, au cours d'un demi-siècle d'activité de recherches. Je remercie tout particulièrement H. Alexandre, E. Baltus, A. Ficq, J. Hanocq-Quertier et R. Tencer qui ont mis à ma disposition

leurs excellents rapports quinquennaux d'activités destinés au Ministère de la Politique et Programmation scientifiques. Tout au long de cet article, le pronom «nous» a été utilisé ; pour tout ce qui va jusqu'en 1945, «nous» est un pluriel de modestie ; pour ce qui suit, «nous» signifie qu'il s'agit d'un travail d'équipe où je jouais, le plus souvent, le rôle de la mouche du coche.

RÉFÉRENCES

- La vie créatrice des formes et des fonctions (Albert Brachet, titre d'un discours rectoral et d'un livre publié en 1927).
- J. BRACHET.— *Introduction to molecular Embryology* (1974). Springer Verlag, N.Y., Heidelberg, Berlin, 176 pp.
- J. BRACHET.— *Introduction à l'Embryologie moléculaire* (1974). Masson, Paris 197 pp.
- E. DAVIDSON.— *Gene activity in early development*. (2^e édition, 1976) Academic Press N.Y.
- F. JACOB.— *Le jeu des possibles*. Editions Fayard, 1981.
-

Paulette Van Gansen

Titre X

Le vieillissement cellulaire en culture et dans les animaux

«Ô rage, ô désespoir, ô vieillesse ennemie !»

Pierre Corneille

Le Cid, 1636.

RÉSUMÉ

Les concepts du «vieillissement» sont ambigus, tant au niveau des animaux qu'à celui des cellules. Des définitions conventionnelles et précises sont proposées, sur une base embryologique, et le degré de généralité de ces phénomènes est discuté.

Les cultures de cellules normales (non cancéreuses) finissent toutes par dégénérer et mourir, selon des modalités propres à la fois à l'espèce animale dont elles sont issues et au type cellulaire qu'elles présentent. Elles constituent des systèmes artificiels de vieillissement cellulaire en flacon (*«in vitro»*). Les caractéristiques connues d'un système de ce type (les cultures de fibroblastes diploïdes de souris) sont présentées et la portée des résultats expérimentaux obtenus est discutée.

L'ensemble des données dont nous disposons actuellement nous conduit à penser que le vieillissement et la mort cellulaires s'inscrivent normalement à la suite de la différenciation cellulaire – qui est déterminée dans l'embryon – et sont donc inéluctables. Au niveau des individus et des populations, hommes ou souris, on peut cependant estimer que les modalités du vieillissement peuvent être améliorées et l'espérance de vie, prolongée.

La vieillesse est un phénomène naturel des populations humaines. Elle n'étonne pas, mais ne plait guère avec son cortège de faiblesse et de maux. L'espoir d'une plus grande sagesse acquise console mal de l'approche de la mort. Les charlatans prometteurs de jeunesse font florès, siècle après siècle. Mais qu'est-ce donc que le vieillissement de l'être ? Est-il inéluctable ? Tous les maux qui le dessinent sont-ils inévitables ?

Ces questions ne sont pas neuves. Elles ont suscité la création, en notre siècle, d'une discipline de recherche, la gériatologie, et d'une spécialité médicale, la gériatrie. Elles connaissent actuellement un regain d'intérêt par la conjonction de situations nouvelles, sociologiques et scientifiques. Les progrès du bien-être, de l'hygiène et de la médecine ont, en cent ans, presque doublé l'espérance de vie des individus dans les populations occidentales : la fraction âgée de ces sociétés est devenue plus grande et le poids des maladies de la vieillesse n'est pas négligeable dans les budgets publics d'aujourd'hui. Par conséquent, dans les années 1970, l'étude du vieillissement a été désignée comme un des trois champs prioritaires de recherches médicales et biologiques au niveau de la Communauté Economique Européenne (Projet «Eurâge»); les Etats-Unis ont créé le «National Institute on Aging» (NIA) qui, au contraire du projet Européen, est doté d'un crédit propre important.

D'autre part, sur le plan scientifique, il est possible depuis 20 ans de tester les hypothèses relatives au vieillissement sur des systèmes expérimentaux plus simples qu'un animal : les cellules en culture. Les méthodes actuelles de la biologie cellulaire peuvent ainsi être appliquées à l'analyse du phénomène, y compris au niveau moléculaire. Depuis 1975, notre unité de recherche s'est consacrée à l'étude d'un tel système, les fibroblastes normaux de souris en culture.

LE VIEILLISSEMENT DES ORGANISMES ANIMAUX

Le concept de vieillissement est ambigu. A sa mère qui lui demande : «Alors, qu'est-ce que t'as fait ?», Zazie répond (*) : «J'ai vieilli». Cette enfant s'exprime avec exactitude. Le vieillissement peut en effet désigner la somme des changements qui se produit *pendant la durée de vie* d'un individu et qui sont communs à tous les membres de son espèce. C'est dans ce sens que Zazie a vieilli pendant les quelques jours de son équipée parisienne. De manière plus courante, le vieillissement désigne aussi tous les changements dépendant du temps, communs à tous les membres d'une même espèce et survenant *après la maturité* de l'individu. Cette définition inclut principalement la période de sénescence, reconnue par le déclin ou la détérioration de structures et

(*) R. QUENEAU, *Zazie dans le métro*, Gallimard, Paris, 1959.

de fonctions qui s'installent pendant la période de vie où le taux de mortalité est accéléré dans la population.

Bien que plus restrictive que la première, cette définition demeure cependant floue, la limite entre les phases de la vie d'un animal étant rarement précise, comme l'évoque le schéma suivant (fig. 1) :

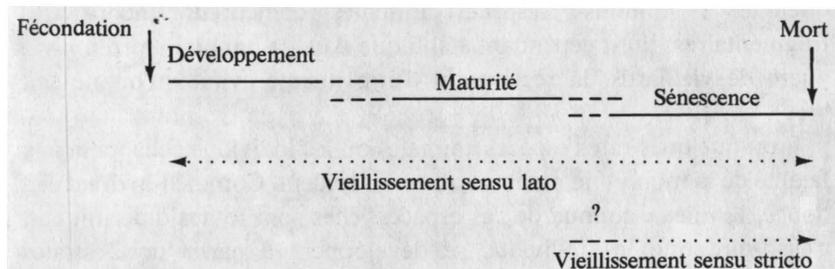


FIG. 1.

L'imprécision du champ d'étude est encore augmentée par la difficulté de distinguer les phénomènes propres à la sénescence des états pathologiques qui accompagnent fréquemment le vieillissement des individus. Pour d'aucuns, cette distinction n'a pas de sens : la sénescence *est* pathologique. Nous ne le pensons pas, mais il est vrai qu'il y a peu de caractères distinctifs de la sénescence animale. Les termes de «vieil homme» et «vieille femme» sont évocateurs pour la plupart d'entre nous. Ceux de «vieux chien» ou «vieille souris» le sont aussi pour les éleveurs de Mammifères. Mais qu'est-ce qu'un vieux poisson ? une vieille mouche ? un vieil oursin ? Le seul caractère apparent qui soit commun à la vieillesse de tous les animaux est qu'elle précède la mort des individus.

Presque tous les animaux sont en effet mortels. *L'espérance de vie* d'un animal est la valeur moyenne de la durée de vie des individus qui consomment la population où il naît. Pour une espèce donnée, elle est très variable avec les conditions de vie des différentes populations. Elle varie de 29 à 76 ans pour les populations humaines actuelles – et nos jeunes hommes de 40 ans ne se reconnaissent guère dans les barbons de même âge décrits par Molière. La *longévité maximale* est une donnée propre à l'espèce, indépendante des conditions de vie. Par contre, elle est très variable d'une espèce à l'autre. Il n'y a aucune relation entre la position dans la phylogénie animale et la durée de la longévité. Des genres proches – chez les Insectes ou les Nématodes, par exemple – peuvent avoir les uns une longévité de quelques semaines et les autres

de plusieurs années. La longévité de l'espèce humaine, de 110 à 115 ans, est la plus longue des Mammifères. Elle n'est dépassée, dans le monde animal, que par celle des tortues des Galapagos (de 150 à 200 ans), sous réserve de données nouvelles. Car en dépit des efforts accomplis, les données concernant les populations naturelles des quelque 2 millions d'espèces animales demeurent encore très fragmentaires. Il est cependant établi que dans la bonne nature il n'y a guère de vieillards, la règle étant d'être mangé avant qu'on ne soit vieux.

Il est quelques rares espèces animales où les individus échappent à la fatalité de la mort et ne meurent que par accident. Comme l'hydre d'eau douce, la mieux connue de ces espèces, elles sont toutes didermiques, c'est-à-dire que les individus se développent à partir de 2 strates embryonnaires initiales et non de 3, comme chez la plupart des animaux. Le troisième feuillet, le mésoderme, est à l'origine du sang, des muscles, des tissus conjonctifs et rénaux. Au niveau des espèces, son acquisition permet l'apparition d'animaux mobiles et volumineux ; le bond évolutif est prodigieux mais – est-ce un tribut ? – tous les animaux tridermiques sont mortels.

LE VIEILLISSEMENT DES CELLULES DANS LES ANIMAUX

Tout animal est constitué d'un grand nombre de cellules, diversement spécialisées, dont les réactions sont parfaitement intégrées. C'est en fait une société de cellules dont les interactions multiples induisent un ensemble remarquable, l'individu, dont les propriétés globales sont qualitativement distinctes des propriétés de chacune de ses parties. L'espèce humaine fournit un exemple de la complexité des organismes animaux : chaque individu est constitué de plusieurs milliards de cellules, ces dernières présentant environ 200 types différents de spécialisations cellulaires. La plupart des cellules qui composent un animal sont mortelles et la période qui précède leur mort est le vieillissement cellulaire. Il nous paraît probable que la compréhension des phénomènes de sénescence des cellules conduise à celle du vieillissement de l'animal, même si la simple sommation des événements cellulaires ne suffit pas à comprendre tous les processus de vieillissement de l'organisme. La définition du vieillissement cellulaire est aussi ambiguë que celle du vieillissement animal et la confusion règne dans la terminologie usuelle. Les longévités des différents types

cellulaires peuvent être à la fois très différentes de celle de l'animal qu'ils composent et très différentes entre elles. Toutes les catégories cellulaires résultent cependant de la division et du développement de la même cellule-œuf initiale et toutes les cellules animales passent par 4 périodes successives :

- 1°) *la détermination* progressive des cellules embryonnaires qui fixe leur destinée, sans que leur apparence soit profondément modifiée,
- 2°) *la différenciation* progressive des cellules déterminées en cellules spécialisées,
- 3°) *la maturité* cellulaire où les fonctions spécialisée s'expriment,
- 4°) *le déclin* cellulaire où les fonctions se détériorent jusqu'à la mort de la cellule.

Les périodes de détermination et de différenciation s'accompagnent généralement de la multiplication des cellules qui en sont le siège. Cette multiplication se fait par division mitotique, qui conserve le patrimoine génétique à travers les générations cellulaires successives. En général il n'y a pas de mitoses pendant la maturité et le déclin ; les limites entre ces deux dernières périodes sont difficiles à discerner. Le *phénotype terminal* d'une catégorie cellulaire est l'apparence des cellules pleinement différenciées de cette catégorie, devenues incapables de se diviser par mitose. Le vieillissement cellulaire peut alors être défini de 3 manières différentes. Il peut être la somme des changements produits dans la cellule au cours du temps :

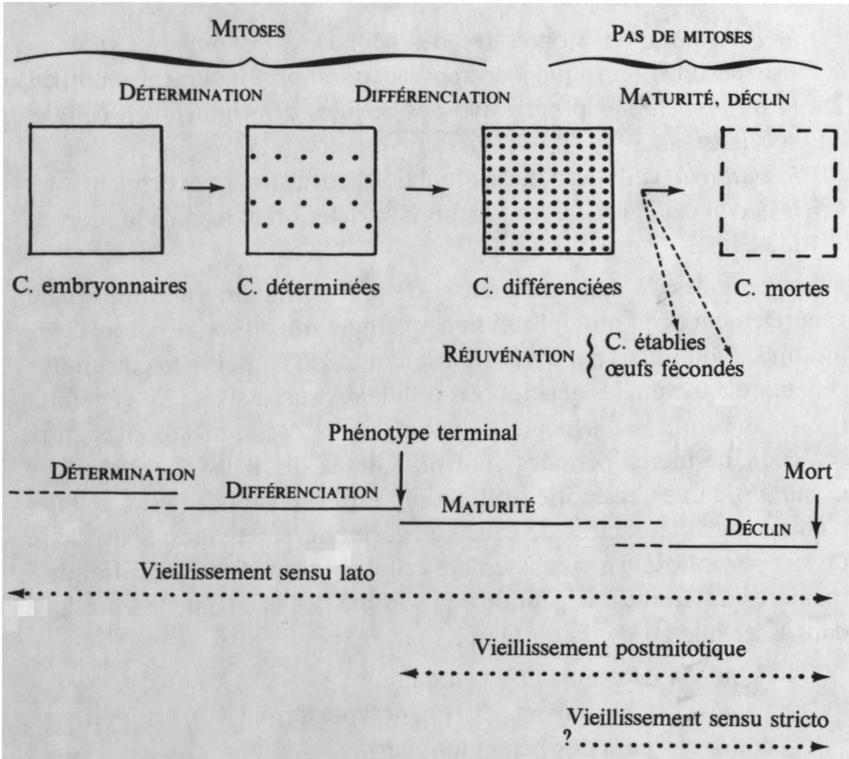
- 1°) depuis la détermination cellulaire,
- 2°) depuis l'établissement du phénotype terminal (c'est-à-dire au cours des périodes postmitotiques),
- 3°) depuis le déclin jusqu'à la mort cellulaire.

Ces concepts sont visualisés dans le schéma suivant (*fig. 2*).

Les longueurs respectives des périodes cellulaires sont très variables d'une catégorie de cellules à l'autre. Prenons 2 exemples extrêmes chez l'homme : les *cellules nerveuses* sont toutes différenciées à la naissance, ne se multiplient pas et au moins la moitié d'entre elles peuvent vivre au moins 100 ans. A l'opposé, les cellules-mères des *globules rouges* (déterminées) se multiplient pendant toute la vie humaine mais les érythrocytes (les globules rouges différenciés) ne se divisent pas et meurent après 120 jours.

On peut effectuer des transplantations successives, dans des animaux jeunes, de tissus prélevés chez des animaux vieux. Ces expériences

montrent que la longévité de certains tissus est supérieure à celle de l'animal dont ils font partie : de la peau de souris a pu être maintenue vivante pendant 7 ans (mais pas davantage) alors que la longévité de ces animaux est d'environ 2 ans (C. W. DANIEL, 1972).



C = cellules.

FIG. 2.

A plus ou moins longue échéance, la différenciation de la cellule paraît entraîner son vieillissement et sa mort. Il existe cependant deux situations qui font exception à cette règle et où des cellules différenciées témoignent d'un rajeunissement indéniable. La première, normale, est liée à la *sexualité* de l'animal. Les cellules germinales (déterminées) sont transformées en cellules sexuelles différenciées, les gamètes, au cours d'une double division très particulière, la méiose. Au contraire de la mitose, la méiose détermine un bouleversement génétique profond dans les cellules qu'elle produit. En l'absence de fécondation, les gamètes meurent rapidement ; mais la fusion de 2 gamètes de types

complémentaires, mâle et femelle, produit une cellule unique, jeune par excellence : l'œuf fécondé dont le développement peut produire un nouvel individu. La seconde situation est anormale, pathologique. La réjuvenation y est exprimée par une cellule normale qui se transforme en une cellule ayant perdu ses propriétés de cellule différenciée, capable de produire une lignée établie. En effet, elle peut se diviser en produisant un nombre indéterminé de générations cellulaires successives : la population transformée est devenue potentiellement immortelle. Toutes les cellules cancéreuses sont des cellules établies. Une population cellulaire établie est généralement hétéropléide, c'est-à-dire que les cellules qui la composent ont un nombre variable de chromosomes. Sexualité et établissement cellulaire s'accompagnent donc l'une et l'autre de remaniements du patrimoine génétique. Ces remaniements sont ordonnés dans le cas de la sexualité et maintiennent le nombre de chromosomes propre à l'espèce. Ils apparaissent désordonnés et variables dans le cas de production de cellules établies. En dehors des bouleversements génétiques propres à la sexualité et à l'anarchie, les cellules animales se différencient, travaillent, vieillissent et meurent.

Les travaux portant sur le vieillissement cellulaire *in situ* analysent les tissus constitutifs d'animaux d'âges connus et croissants. Ils apportent une foule de données intéressantes relatives à l'évolution des propriétés de ces tissus en fonction de l'âge de l'animal. La complexité et l'intégration des systèmes analysés est cependant telle qu'il est rarement possible de décider si les changements constatés relèvent des propriétés intrinsèques du tissu analysé ou sont la conséquence de changements qui se sont produits ailleurs dans l'animal. Prenons les *tissus conjonctifs* des Mammifères, tissus présents dans la plupart des organes et très abondants dans la peau, les os, les cartilages et les tendons. Ces tissus sont formés de cellules, les fibroblastes, disséminées dans une matrice extracellulaire contenant des fibres d'élastine et de collagène. Les fibroblastes sécrètent des molécules de collagène qui se polymérisent en fibre à l'extérieur des cellules. Les collagènes constituent environ 25 % des protéines totales du corps. De nombreux travaux ont établi que les propriétés des fibres de collagène se modifient avec l'âge. Les altérations en quantité et en qualité des fibres d'élastine et de collagène sont responsables d'une série de traits sénescents des vieux Mammifères (rides et inélasticité de la peau, raideur articulaire, etc) et sont peut-être à l'origine de l'incidence élevée, propre à la

vieillesse, des rhumatismes («maladies des collagènes»). Mais on ignore si ces altérations sont dues au vieillissement des fibroblastes producteurs de collagène ou à des modifications du milieu extracellulaire ou encore aux effets cumulés, interactifs, des changements des fibroblastes et de leur milieu.

LE VIEILLISSEMENT CELLULAIRE EN CULTURE (*in vitro*)

En 1961, L. Hayflick découvrit que les fibroblastes, isolés d'embryons humains, produisaient en culture un nombre limité, défini, de générations cellulaires. Après 50 ± 10 générations cellulaires, la culture décline et meurt. Le phénomène fut baptisé «vieillissement cellulaire *in vitro*». D'abord accueilli avec incrédulité, il fut confirmé dans divers laboratoires. Il apparut que le nombre de générations cellulaires produites dépendait de l'espèce (homme, souris, poulet, ...) de l'animal dont les fibroblastes étaient isolés. De plus, ce nombre était inversement proportionnel à l'âge de l'animal donneur et fortement réduit chez des humains atteints des maladies rares à syndrome de «progéria» ou vieillissement précoce (progéria de Werner, progéria infantile de Hutchinson-Gilford). Depuis quelques années, le vieillissement cellulaire a été observé dans des types cellulaires autres que fibroblastiques (hépatocytes, chondrocytes, cellules du cristallin de l'œil, cellules épidermiques de la peau), beaucoup plus difficiles à cultiver que les fibroblastes. Actuellement, aux Etats-Unis, le NIA stimule fortement les travaux de comparaison entre les cellules humaines vieillissant en culture et dans l'homme. Si la découverte de L. Hayflick mit dix ans à s'imposer, c'est qu'elle était contraire aux idées reçues sur les cultures de fibroblastes, réputées «immortelles» depuis les célèbres travaux, vieux d'un demi-siècle, de A. Carrel et A. H. Ebeling. Pourtant les observations de Carrel sur les cultures de fibroblastes normaux de poulet n'ont jamais pu être refaites (et étaient probablement dues à une réinjection involontaire de fibroblastes «jeunes» présents dans les extraits d'embryons dont les cultures étaient nourries). Mais les scientifiques étaient habitués à éliminer les «mauvaises» cellules qui dégénéraient en culture et à ne garder que les «bonnes» qui acceptaient de se laisser cultiver. On avait observé que les tissus cancéreux se cultivaient très bien et la plupart des travaux ont été effectués sur des cultures établies dérivées de ces tissus, comme les cellules «He La», utilisées dans les laboratoires du monde entier et à

l'origine de découvertes fondamentales propres à la biologie cellulaire. En fait, en utilisant la terminologie de Hayflick, on travaillait sur les *lignées établies* («lines») de cellules anormales hétéroplœides et non sur des *souches* («strains») de cellules à nombre normal, diploïdes, de chromosomes (1).

L'existence du phénomène reconnu par L. Hayflick est aujourd'hui admise par tous mais la querelle portant sur la valeur des systèmes cellulaires «vieillissant *in vitro*» n'est toujours pas éteinte. Il est vrai que le nombre de générations produites par une souche cellulaire fluctue avec les conditions de culture : la qualité du sérum, certaines hormones (hydrocortisone), des facteurs de croissance (EGF, FGF) (2) peuvent augmenter ce nombre. La prolifération cellulaire demeure cependant limitée dans le temps, sauf dans un système, celui du cristallin, où un facteur extrait de la rétine permet la prolifération indéfinie des cellules-souches du cristallin en culture (C. ARRULI et Y. COURTOIS, 1978). D'autre part, rien ne permet d'affirmer que les propriétés exprimées par les cellules cultivées sont le reflet fidèle de celles exprimées dans l'animal. Il n'en reste pas moins que ces propriétés dépendent des potentialités génétiques normales des cellules diploïdes. Leur culture fournit des modèles expérimentaux permettant de tester les théories du vieillissement cellulaire. Ces théories sont nombreuses et probablement non exclusives les unes des autres : nous pensons, avec la plupart des auteurs récents, que la sénescence d'un animal peut avoir des origines multiples.

On peut grouper les théories du vieillissement en deux ensembles s'opposant par l'importance relative accordée aux divers facteurs déterminant le phénomène. Les unes, *les théories «stochastiques»*, accordent une importance primordiale aux accidents (des mutations par exemple) qui se produisent aux hasards d'une vie. Les plus célèbres de ces théories sont les versions successives de la théorie des catastrophes de Orgel (1963, 1973). Les autres, *les théories «programmées»*, imaginent que le vieillissement et la mort font partie du développement normal d'une cellule ou d'un animal. L'enjeu de la dispute est de taille : il s'agit de savoir si la sénescence et la mort sont fatales ou accidentelles,

(1) Dans la terminologie de G. M. MARTIN (1977), les lignées établies sont appelées lignées néoplastoïdes («neoplastoid lines») et les souches normales, lignées hyperplas-toïdes («hyperplastoid lines»).

(2) EGF epithelial growth factor, FGF fibroblastic growth factor.

c'est-à-dire en principe évitables. On comprend que les discussions soient souvent passionnées dans ce domaine.

LES FIBROBLASTES NORMAUX DE SOURIS VIEILLISSANT *in vitro*

Un inconvénient des fibroblastes embryonnaires humains en culture est qu'ils «vieillissent» lentement : il s'écoule environ 6 mois entre le début et la fin de la culture (50 générations plus tard), ce qui ralentit les possibilités de comparaison entre les populations cellulaires jeunes et âgées. Dans notre laboratoire, l'unité de recherche consacrée au vieillissement cellulaire a choisi d'utiliser les fibroblastes diploïdes de souris, dont la culture décline après environ 10 générations cellulaires, soit 1 mois après l'isolement des fibroblastes embryonnaires. En outre les embryons de souris sont aisément accessibles et les races de souris utilisées sont génétiquement mieux définies que les donneurs humains.

Le désavantage des cultures de cellules des Muridés, qui en écarte nombre de laboratoires où l'on étudie le vieillissement, est qu'elles se transforment aisément en lignées établies – qui ne vieillissent plus du tout. Depuis 1975, l'analyse d'un grand nombre de souches différentes nous a cependant permis de rassembler des données expérimentales cohérentes sur ce système.

Le relativement petit nombre de générations cellulaires produites nous a permis de suivre l'évolution des fibroblastes, génération après génération, depuis la primoculture jusqu'à la génération terminale (atteinte en 1 mois dans nos conditions de culture). Nous avons pu établir ainsi le phénotype terminal des fibroblastes de souris en culture, phénotype qui n'est toujours pas clairement défini chez les fibroblastes d'homme ou de poulet. De plus nous avons entrepris de suivre l'évolution postmitotique des cellules terminales, jusqu'à l'extinction de la culture (qui survient de 15 jours à 1 mois après le dernier ensemencement possible). Ce type d'observation n'a pas été fait sur les fibroblastes d'autres espèces animales. Nous avons analysé :

- 1°) la morphologie cellulaire, en particulier la surface des cellules,
- 2°) les propriétés du noyau liées aux divisions cellulaires (index mitotique, teneur en DNA, sa réplication, sa sensibilité à l'aphidicoline, le taux de liaison de l'actinomycine à la chromatine),
- 3°) des propriétés de la transcription (ou synthèse des RNA), c'est-à-dire de l'expression du génome,
- 4°) les structures des organites, en particulier du cytosquelette des cellules (filaments et microtubules).

Nous avons allié des méthodes propres à la microscopie électronique (à balayage et à transmission), à la cytochimie (autoradiographie, microphotométrie, immunocytochimie) et à la biochimie (dans les travaux sur la transcription). Nous n'avons encore que très peu de données sur les traductions protéiques (en particulier du collagène) et aucune sur les membranes plasmiques, dont l'analyse est inscrite dans nos projets immédiats.

L'aspect des fibroblastes change fortement en fonction de l'âge de la souche cultivée. Quel que soit cet âge, les fibroblastes ont des volumes variables mais la valeur moyenne du volume cellulaire, dans les populations, augmente progressivement au cours des générations successives. D'autre part, les cellules s'étalent de plus en plus sur le support, qu'il soit de verre, de plastique ou de collagène. Petites et d'aspect charnu dans les populations initiales, elles sont devenues grandes et plates dans la population terminale (*figure 3*). La surface projetée des fibroblastes terminaux est, en valeurs moyennes, 5 fois plus grande que celle des premières générations. Tous les fibroblastes émettent des expansions filiformes, les filipodes, parfois très longs, étendus sur le support et sur les cellules voisines. Il n'y en a que quelques uns par cellule au début de la culture mais leur nombre augmente progressivement et peut devenir très grand dans les fibroblastes terminaux. De plus – mais le phénomène n'est pas constant d'une souche à l'autre – les fibroblastes terminaux se couvrent d'une fourrure de microvillosités, toujours complètement absentes dans les générations précédentes. L'étendue de la surface cellulaire réelle, filopodes et microvillosités compris, augmente ainsi d'une manière qu'il est difficile de quantifier mais qui est certainement considérable (de 100 à 1000 fois d'après des estimations grossières sur micrographies électroniques).

Les cellules terminales sont très belles et leur aspect ne change guère au cours de la période postmitotique. Mais un nombre de plus en plus grand de fibroblastes entrent en lyse, jusqu'à l'extinction de la culture. Les images d'agonie cellulaire sont très différentes en début et en fin de culture. Dans les deux cas, classiquement, le cytoplasme émet des protubérances en forme de bulles («blebs») qui, en crevant, entraînent la lyse cellulaire. Mais lorsque les cellules jeunes meurent (par exemple à la suite d'une carence sévère en sérum), elles se ramassent en boule, restant amarrées au support par un enchevêtrement de traînées cytoplasmiques. Les cellules postmitotiques mourantes demeurent

étalées sur le support tout en se trouant de lacunes de plus en plus grandes ; elles se réduisent finalement aux «empreintes cellulaires» bien connues des observateurs de culture.

La réplication du DNA comme l'activité mitotique diminuent fortement dans les fibroblastes de souris en fonction de l'âge de la culture. La fréquence des mitoses dans les souches de fibroblastes diminue progressivement dans les générations successives jusqu'à n'être que de 5%, au plus, dans les populations terminales. En même temps, la durée moyenne du cycle cellulaire s'allonge, passant de 24 heures à 3 jours ou plus. La capacité de répliquer le DNA diminue aussi progressivement avec l'âge, sans disparaître. En effet, en permettant aux cultures âgées d'incorporer un précurseur radioactif du DNA (^3H -Thymidine) pendant des temps longs (24 heures ou plus), on s'aperçoit que la capacité de synthèse est toujours présente dans la plupart des cellules terminales mais que le phénomène est devenu extrêmement lent. Une autre approche expérimentale, la mesure de la teneur en DNA par noyau cellulaire, met en évidence plusieurs phénomènes distincts. Environ 20% des fibroblastes terminaux ont une teneur anormale en DNA ; ce sont des mutants de divers types aneuploïdes ou polyploïdes. 80% des fibroblastes terminaux ont toujours une valeur diploïde de DNA, c'est-à-dire qu'ils paraissent avoir le nombre normal de chromosomes, comme toutes les cellules des cultures initiales. Parmi les cellules terminales diploïdes, les 3/5 sont en G1 (la phase préréplicative de la période intermitotique), 1/5 sont en S (la phase répllicative) et 1/5 sont en G2 (la phase postréplicative de la période intermitotique). Ce tableau contraste avec celui des cellules jeunes qui, lorsqu'elles sont en croissance, sont à tout moment à plus de 50% en phase S ou qui, lorsqu'elles sont induites en quiescence (par confluence des fibroblastes ou par carence sérique), sont à plus de 95% bloquées en phase G1. Ajoutons que la proportion de fibroblastes avec 2 noyaux – où la division du cytoplasme n'a pas suivi celle du noyau – augmente aussi en fonction de l'âge de la culture. La génération terminale présente ainsi toute une gamme d'états cellulaires différents : fibroblastes aneuploïdes (10%), fibroblastes normaux (80%) en G1, en S, en G2 et fibroblastes polyloïdes et binuclées (10%). Outre l'apparition de mutants, tout se passe dans la génération terminale comme si les événements préparatoires et propres à la mitose étaient ralentis, la vitesse de réplication étant très diminuée et les phases G1 et G2 très allongées ainsi que les phases finales de la

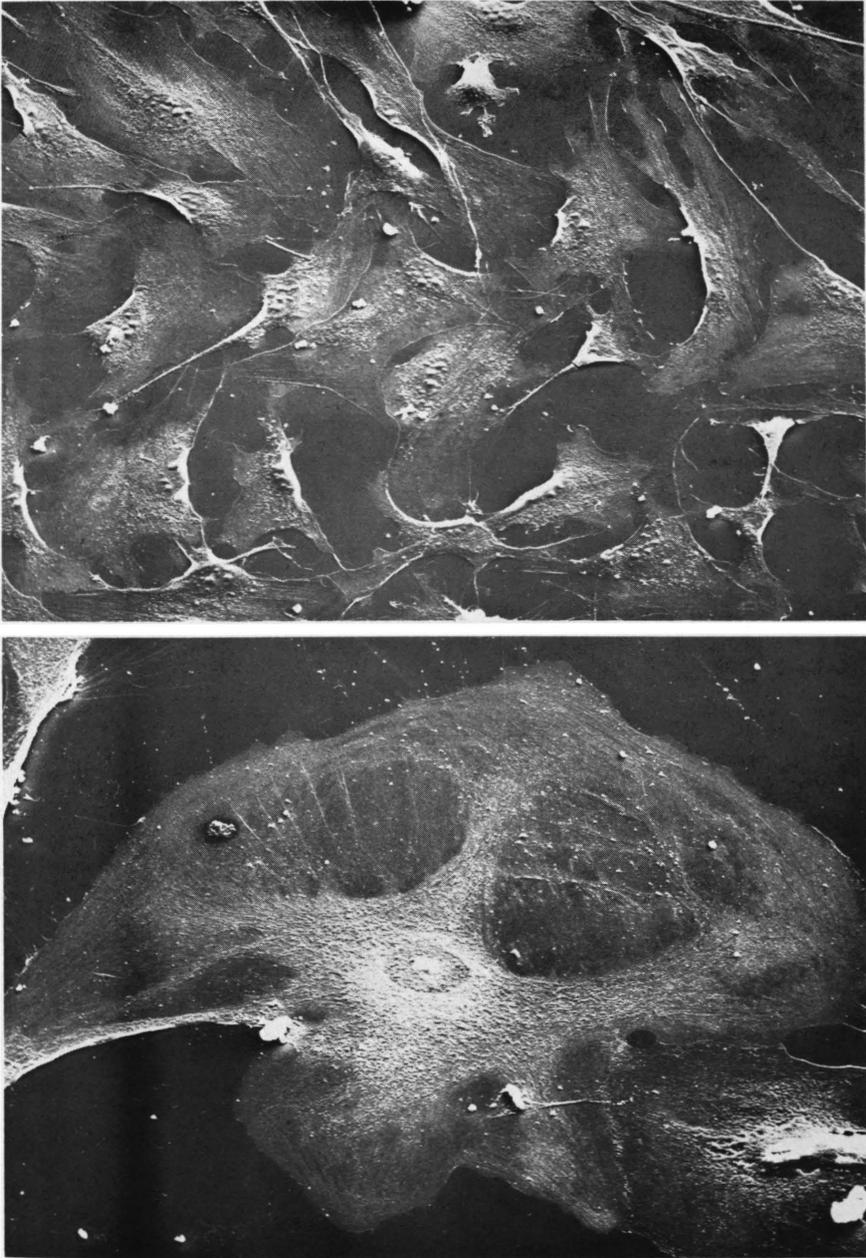


FIGURE 3.— *Aspect des fibroblastes de souris en culture.* (Microscopie électronique à balayage)

En haut : Deuxième sous-culture après l'isolement des fibroblastes d'embryons de souris.

En bas : Cellule de la sous-culture terminale.

Les 2 photos sont montrées au même grossissement (X 420).

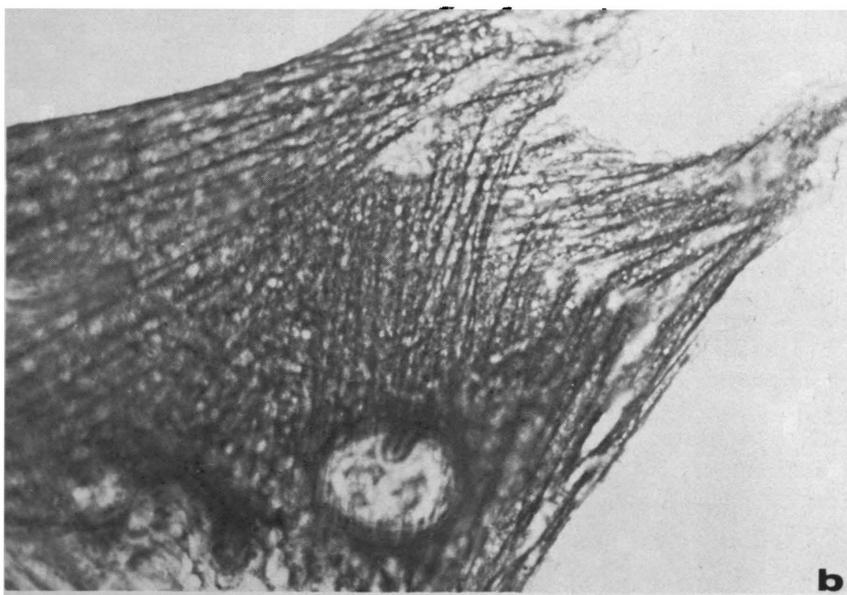
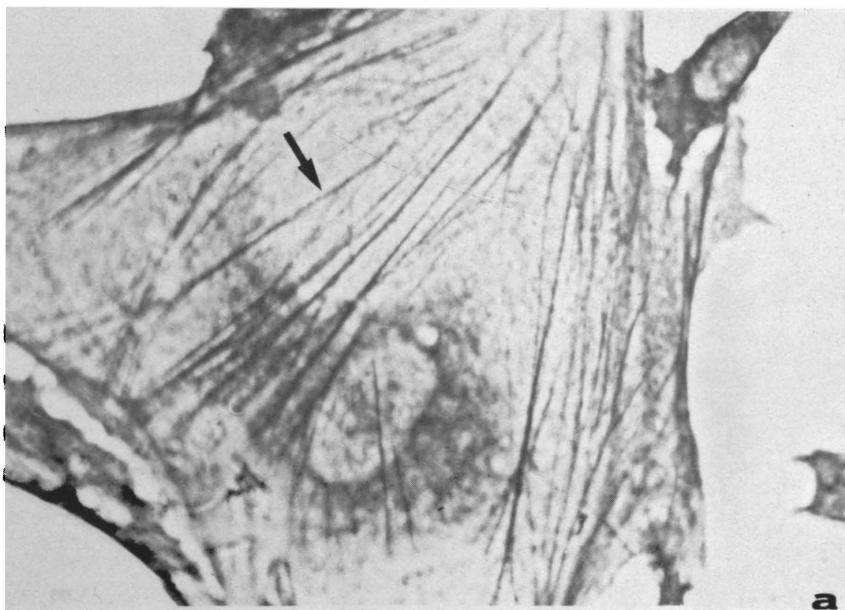


FIGURE 4.— *Distribution des microfilaments d'actine dans les fibroblastes de souris (méthode immunocytochimique).*

a. Fibroblaste d'une culture jeune (X 875).

b. Fibroblaste d'une culture terminale (X875)

Les fibroblastes figurés ont été choisis parce qu'étant d'une part typique de chaque population quant aux microfilaments et d'autre part de taille et de forme similaires.

division nucléaire (cellules polyploïdes) et cytoplasmique (cellules binucléées). La morphologie du noyau évolue également de manière progressive de la primoculture à la population terminale. Sa taille est de plus en plus variable, son diamètre moyen augmente, sa surface devient de plus en plus indentée.

Le nombre de nucléoles par noyau, toujours variable dans la population, diminue en moyenne de moitié du début à la fin de la culture (de 3 à 1.5 nucléoles). Beaucoup de ces organites ont une structure ségrégée – signe de dysfonctionnement – dans la génération terminale. La chromatine forme des amas, toujours petits, mais de plus en plus grands et de plus en plus nombreux. Elle fixe de moins en moins d'actinomycine, après fixation des fibroblastes. Appliqué à des cellules fixées, cet antibiotique rendu radioactif est utilisé comme marqueur hautement spécifique des structures à DNA. Pour une même quantité de DNA, la chromatine lie d'autant plus d'actinomycine qu'elle est plus déployée, c'est-à-dire plus activement répliquée et transcrite. Dans les populations terminales, 40 % des fibroblastes fixent moins d'actinomycine que les cellules les moins marquées des jeunes générations rendues quiescentes. Un résultat analogue avait été obtenu précédemment sur les lymphocytes stimulés issus de donneurs humains de différents âges. Les résultats sur les fibroblastes ne peuvent être expliqués ni par des proportions différentes de cellules répliquatives (les populations comparées étant toutes deux quiescentes), ni par la présence de mutants pauvres en DNA (les aneuploïdes par défaut ne représentant que 10 % de la population terminale). Ils paraissent donc dépendre d'une configuration de la chromatine spécifique des fibroblastes terminaux. Nous ne savons pas encore si l'altération chromatinienne observée est due à la présence de petites coupures dans un des brins du DNA, dommages des gènes qui diminuent l'affinité de l'actinomycine pour la chromatine, ou à la présence de protéines associées particulières, événement épigénétique qui peut réduire l'accessibilité du DNA. Les 2 phénomènes peuvent d'ailleurs concourir à l'effet observé.

Les synthèses des RNA – la transcription du génome – ont été comparées dans les cellules au début et à la fin des cultures. Des méthodes expérimentales très différentes, biochimiques et autoradiographiques, ont prouvé que ces synthèses avaient des caractères nettement distincts dans les deux situations. On ignore encore si les changements dans le métabolisme du RNA s'installent progressivement

au cours des générations successives ou s'ils apparaissent brutalement dans la génération terminale. Les résultats expérimentaux obtenus jusqu'à présent sont en effet en partie contradictoire et de nouvelles recherches doivent être effectuées avant de pouvoir trancher cette question. La teneur en RNA n'est pas sensiblement différente dans les fibroblastes initiaux et terminaux. Cependant la *vitesse* de la synthèse de RNA nouveaux est réduite de moitié dans les populations terminales par rapport aux populations initiales. De plus, dans les fibroblastes jeunes, les RNA polymérase (les enzymes de la transcription) sont présentes à la fois dans la chromatine (enzymes «liées») et dans le suc nucléaire (enzymes «libres»). Dans les fibroblastes terminaux, les enzymes libres sont presque absentes, réduites à 5% des valeurs «jeunes». Une analyse plus fine montre que les synthèses des différentes catégories de RNA sont atteintes de manière très différente par l'âge des cellules : les synthèses des RNA messagers et des RNA de transfert (transcrits par les RNA polymérase II et III) ne sont réduites que de 30% tandis que les synthèses des RNA ribosomiaux (transcrits par la RNA polymérase I du nucléole) sont réduites de 70%. La thermosensibilité des RNA polymérase est plus grande dans les fibroblastes terminaux que dans les fibroblastes jeunes. Une variation de ce type est fréquemment utilisée par les tenants de la théorie d'Orgel comme preuve d'une «catastrophe moléculaire» c'est-à-dire d'un changement de la composition de l'enzyme. Dans le cas des RNA polymérase, il n'en est rien (Ch. EVANS, 1977). Les thermosensibilités des RNA polymérase I, II et III sont différentes : c'est le changement dans la proportion des 3 types d'enzymes qui confère une plus grande thermosensibilité à l'activité RNA polymérase totale des fibroblastes âgés. Comme la réplication, la transcription est donc ralentie dans les fibroblastes terminaux, le plus fortement au niveau des nucléoles, lors de la synthèse des RNA ribosomiaux. La structure propre des RNA polymérase ne paraît pas atteinte mais leur teneur et, partant, leur activité est déprimée au sein de la chromatine, et particulièrement dans la chromatine nucléolaire.

La structure fine du cytoplasme se modifie également avec l'âge des fibroblastes, notamment dans la proportion des ribosomes libres ou liés à des membranes. Les ribosomes sont les organites qui traduisent les RNA messagers en protéines. Les ribosomes liés aux membranes (l'ergastoplasme) sont spécialisés dans la synthèse des protéines destinées à l'exportation extracellulaire. Les ribosomes libres sont

toujours très abondants dans les fibroblastes. Mais les vésicules ergastoplasmiques, nombreuses et dilatées dans les cellules jeunes, deviennent rares et plates dans les fibroblastes terminaux. Or, dans les micrographies électroniques, les fibroblastes des jeunes cultures sont toujours accompagnés de fibres de collagène alors que ces fibres sont absentes dans les images des cultures terminales. Il est donc tentant d'imaginer que les fibroblastes terminaux ne secrètent plus de collagène, c'est-à-dire perdent la fonction qui les définit en ordre principal. Le fait n'est cependant pas prouvé et notre hypothèse demande à être testée par l'expérience.

Mais l'effet le plus spectaculaire de l'âge sur le cytoplasme réside dans les changements montrés par divers composants du cytosquelette des fibroblastes : microfilaments, filaments intermédiaires et microtubules.

Ces structures, qui participent à la motilité cellulaire, paraissent à la fois hypertrophiées et désorganisées dans les cultures terminales (*figure 4*). Au microscope électronique, dans les cellules jeunes, les microfilaments apparaissent comme bien parallèles, assemblés en faisceaux minces et bien distincts les uns des autres. Au microscope à lumière, ces faisceaux ont l'apparence de fibres rectilignes, les «stress fibres» des auteurs anglo-saxons. Dans les parties étalées des cellules, les faisceaux se dessinent en relief et ont l'aspect de câbles lorsqu'on les observe au microscope électronique à balayage. Dans les générations intermédiaires, les faisceaux s'élargissent et leur nombre augmente mais les microfilaments, parallèles entre eux, y sont encore bien ordonnés. Dans les cellules terminales, les microfilaments envahissent presque tout le volume cellulaire. Les faisceaux sont très nombreux et s'étirent dans tous les sens parmi un enchevêtrement de microfilaments distribués de manière anarchique. Même dans les faisceaux, nombre de microfilaments ne sont plus parallèles entre eux. Les microtubules suivent une évolution analogue. Discrets et parallèles aux faisceaux de microfilaments dans les jeunes fibroblastes, ils sont très abondants dans les cellules terminales où ils paraissent perdre toute orientation préférentielle. Nous avons entrepris de visualiser la topographie des composantes du cytosquelette, par immunocytochimie au niveau du microscope à lumière, grâce à l'utilisation d'anticorps dressés spécifiquement contre les protéines principales de ces composantes : actine des microfilaments, desmine des filaments intermédiaires (de

muscles) et tubulines des microtubules ⁽¹⁾. L'utilisation de l'antiactine et de l'antitubuline confirme et précise les résultats obtenus par l'observation des microfilaments et des microtubules aux microscopes électroniques à transmission et à balayage. Dans les fibroblastes postmitotiques, l'actine (ou la tubuline) est distribuée en fibres nombreuses, orientées dans tous les sens, ainsi qu'en flaques périnucléaires de forme et d'étendue variable. Dans certaines cellules (agonisantes ?), on n'observe plus que des flaques encombrant le cytoplasme. Les observations faites sur les filaments intermédiaires sont surprenantes et encore non expliquées. Dans toutes les générations qui précèdent la culture terminale, seulement 10 à 20% des fibroblastes possèdent ce type de filament (ce qui explique qu'ils n'ont été qu'occasionnellement observés au microscope électronique). Dans la génération terminale, presque tous les fibroblastes possèdent des filaments intermédiaires, bien développés en un réseau de fibres flexueuses caractéristiques et réagissant avec l'anti-desmine.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En culture, les fibroblastes terminaux de souris apparaissent donc comme des cellules de grande taille, très étalées sur leur support, et dont la surface, par ses expansions multiples, présente un développement énorme. Leur cytoplasme est encombré de microfilaments, filaments intermédiaires et microtubules, formant un cytosquelette hypertrophié et désorganisé. Elles ne sont plus capables de se diviser. Un certain nombre de leurs fonctions sont ralenties, les unes modérément comme la synthèse des RNA messagers et de transfert, les autres fortement comme la réplication du DNA, la synthèse des RNA ribosomiaux et probablement aussi la synthèse du collagène. La plupart sont des cellules diploïdes, comme tous les fibroblastes de la primoculture, mais un certain nombre, environ 20%, sont des mutants aneuploïdes et polyploïdes (un pourcentage similaire de mutants a été trouvé dans les fibroblastes humains en culture terminale).

Plusieurs des propriétés des fibroblastes terminaux apparaissent progressivement au cours des générations cellulaires successives :

⁽¹⁾ Ces anticorps nous ont été généreusement fournis par les Drs M. De Brabander et J. De Mey (Janssen Pharmaceutica, Beerse), auteurs de la méthode de visualisation des anticorps que nous avons utilisée (méthode au complexe peroxydase-antiperoxydase).

l'installation du phénotype terminal présente les caractères d'une différenciation cellulaire. Les cellules différenciées meurent les unes après les autres ce qui se traduit par le déclin puis l'extinction de la population terminale.

Ce qui est troublant dans le système, c'est que le phénotype terminal des cellules en culture n'est jamais présenté par les fibroblastes vivant dans l'animal. Quel que soit l'âge des souris, y compris chez les grandes vieillardes de 2 ans et demi, les fibroblastes de la peau ont toutes les caractéristiques de fibroblastes «jeunes» en culture (N. Van Lerberghe, résultats non publiés). Les microfilaments y sont même nettement moins développés que dans les populations en début de culture. Cependant si les fibroblastes sont isolés de peaux embryonnaires puis cultivés, ils présentent les mêmes caractères que les fibroblastes isolés d'embryons totaux, que nous utilisons habituellement. Tout se passe comme si les fibroblastes vieillissaient lentement dans la peau de l'animal. On peut rappeler que des expériences de transplantation ont montré que la longévité maximale de la peau (7 ans) est de loin supérieure à celle de la souris (2 ans 1/2). Malheureusement, rien n'est connu des propriétés des fibroblastes des peaux de 7 ans qui finalement dégénèrent dans de jeunes animaux. Il semble donc que dans les conditions artificielles de la culture, les fibroblastes, induits à se diviser un grand nombre de fois, expriment des potentialités génétiques qu'ils n'ont pas le temps de manifester dans l'animal.

Il est difficile d'établir la séquence exacte de l'apparition des caractères propres aux fibroblastes terminaux. Il est cependant établi que l'inhibition expérimentale de la division cellulaire chez les jeunes fibroblastes entraîne l'apparition de certains caractères terminaux. L'aphidicoline, antibiotique de découverte récente, est un inhibiteur spécifique de la DNA polymérase α , la principale enzyme de la réplication. Son application à de jeunes fibroblastes détermine le grandissement et l'étalement cellulaire – mais ne modifie pas le cytosquelette. Des travaux antérieurs ont montré que l'inhibition de la mitose par carence sérique donne à la transcription des fibroblastes jeunes tous les caractères de la transcription des fibroblastes terminaux. Mais le fait d'être affamées peut avoir sur les cellules des effets autres que d'inhiber la mitose. Or il nous paraît possible que la désorganisation des microfilaments s'accompagne d'une modification de la membrane cellulaire dans laquelle on sait qu'ils sont ancrés. La membrane modifiée pourrait ne plus être capable d'assurer les

transports alimentaires nécessaires aux cellules : les fibroblastes terminaux, paralysés, finiraient par mourir de faim. Ce ne sont encore là que des hypothèses de travail, peut-être simplistes, mais susceptibles d'être testées par l'expérience.

Les données de la littérature et nos résultats sur les fibroblastes de souris nous conduisent à penser que le vieillissement et la mort cellulaires s'inscrivent normalement à la suite de la différenciation cellulaire. Tout se passe comme si, pour des raisons encore inconnues, la chromatine se figeait dans une configuration particulière, après une série de divisions cellulaires dont le nombre est fixé par la détermination préalable de la souche cellulaire, dans l'embryon. Cette configuration permettrait l'expression privilégiée de certains gènes, expression propre à l'état différencié acquis par la cellule, tout en réduisant les capacités de modulation de l'expression du génome (et aussi sa réplication). En termes génétiques, les cellules différenciées seraient des variants phénotypiques stables. La détérioration cellulaire se produirait nécessairement dans ce système cellulaire génétiquement figé, mais à plus ou moins longue échéance selon le type de différenciation acquis. De manière plus imagée, disons que les cellules différenciées meurent toutes nécessairement mais que chaque type de cellule meurt à sa façon et plus ou moins vite. Le secret du vieillissement cellulaire est enfermé dans le secret de la détermination embryonnaire : l'étude de la sénescence nous ramène à celle de l'œuf initial. Comme beaucoup d'auteurs contemporains, il nous paraît cependant vraisemblable que l'apparition de mutants contribue au déclin des populations cellulaires – quand elle ne produit pas de lignées établies, dépourvues à la fois de différenciation et d'inhibition mitotique. En fait, il faut deux conditions pour qu'une cellule mutante apparaisse dans la population : qu'un accident génétique se produise mais aussi que les systèmes de réparation n'aient pas ou aient mal fonctionné. Un article retentissant (R. W. HART *et alii*, 1979) a montré que chez les Mammifères, la longévité des espèces était directement proportionnelle à l'efficacité des enzymes de réparation. Les expériences d'hybridation cellulaire nous paraissent cependant démontrer que la plupart des «vieux» fibroblastes en culture sont des variants phénotypiques (au génome intact) et non des mutants (au génome altéré) : la fusion expérimentale d'un fibroblaste vieux et d'un fibroblaste établi produit un hybride où le vieux noyau recommence à se diviser (T. H. NORWOOD *et alii*, 1979). L'œuf fécondé, cellule jeune

par excellence, est d'ailleurs un hybride naturel entre un ovule et un spermatozoïde, cellules très différenciées, incapables de se diviser et de survivre.

Dans quelle mesure, les données expérimentales acquises nous éclairent-elles sur la longévité de l'espèce humaine ? Sans être prophète ni futurologue, il nous paraît raisonnable de faire deux paris optimistes et une prédiction lugubre – si l'on ne tient compte que des seules données biologiques et médicales. Il est possible de devenir vieux sans souffrir de quantités de handicaps pénibles et débilitants : le pourcentage d'individus vieillissant dans cet état favorable peut être fortement augmenté. Il est probable qu'un nombre de plus en plus élevé d'individus peut devenir centenaire et que l'espérance de vie des populations humaines peut donc être augmentée. Ce sont les espoirs des gérontologues et ils nous paraissent légitimes. Nous pensons cependant que l'homme, comme tout animal différencié, continuera à mourir à son terme, fixé par son essence même. L'individu continuera à ne se survivre que dans ses descendants. Sa mort paraît inéluctable. Il ne serait pas sage de le regretter.

RÉFÉRENCES

- LAMB (Marion J.)– *Biology of ageing*. Glasgow and London. Ed. Blackie (collection «Tertiary level Biology»), 1977, 184 PP.
- FINCH (C. E.) and HAYFLICK (Leonardo).– éditeurs scientifiques. *Handbook of the biology of Aging*. New-York. Ed. Nostrand Reinhold Cy. 1977, 771 pp.
-

Titre XI
L'organisation du temps biologique :
les cycles de 24 heures
et leur rôle probable
dans la différenciation

RÉSUMÉ

Les rythmes circadiens (RC) modulent une multitude d'activités et de réponses physiologiques au cours du cycle de 24 h, optimisant l'utilisation de l'énergie. L'étude de leur mécanisme moléculaire n'en est qu'à ses débuts.

La rythmicité circadienne fait partie de notre patrimoine génétique ; c'est à l'intervention de mRNA que l'information passe du noyau au cytoplasme ; le rôle éventuel de la synthèse protéique est controversé. On n'explique actuellement, ni le mécanisme qui engendre les RC, ni leurs propriétés.

L'algue unicellulaire et uninucléé *Acetabularia* est un excellent modèle pour l'étude moléculaire de la rythmicité. Elle présente à la fois des RC chloroplastiques (notamment ultrastructuraux) et des RC indépendants de ces organites. Sur la base de nos expériences, nous proposons que la membrane thylacoïde des chloroplastes constitue le support du RC de la photosynthèse d'*Acetabularia* : le rythme dépend de sa conformation variable (expériences de fluorescence) et de sa composition variable selon le cycle de 24 h (teneur en acides gras).

L'auxine (une des hormones végétales) dont nous avons montré l'existence dans *Acetabularia*, intervient dans la rythmicité des chloroplastes. Elle agit sur la phase du RC de photosynthèse ; son antagoniste modifie la phase du RC de synthèse des polysaccharides chloroplastiques. Nous proposons qu'elle synchronise les rythmes des chloroplastes.

Les RC joueraient un rôle dans la régulation de la morphogénèse. 1) chez les algues en croissance, des perturbations soit du cycle de lumière et d'obscurité soit de l'auxine ont, sur la vitesse d'apparition des chapeaux, des effets dépendant du moment de leur application dans le cycle de 24 h. 2) pendant leur phase de grande croissance – et pendant cette phase seulement – les *Acetabularia* présentent à la fois un RC de teneur en AMP cyclique et une

grande sensibilité aux substances qui modifient la teneur en AMP cyclique endogène.

LE TEMPS, DONNÉE DE LA BIOLOGIE

On a pris conscience, voici quelques années, de l'importance du temps en biologie, cette organisation naturelle du temps en cycles de périodes longues, brèves ou de moyenne durée. Parmi ces derniers, ceux qui couvrent des périodes d'environ 24 h sont appelés de façon significative rythmes circadiens (RC), du latin *circa diem*. Ces rythmes sont inhérents à tous les organismes supérieurs ; ils ne résultent pas simplement de l'alternance du jour et de la nuit.

Leur perturbation est désagréablement ressentie par l'homme qui, ayant traversé des fuseaux horaires, doit réorganiser ses activités dans le temps. La perturbation des rythmes est pénible pour les travailleurs «postés» qui changent d'horaire chaque semaine de manière à couvrir 24 h par trois équipes (les «3 × 8»). Chez ces travailleurs, des troubles du sommeil apparaissent fréquemment et, parfois, des troubles physiologiques plus graves. Un Symposium important organisé par le Dr Reinberg (Paris) vient d'être consacré aux problèmes posés par ce type de travail. Une autre expression bien connue des RC chez l'homme est le moment de la journée auquel les crises d'asthme sont les plus violentes. Ce phénomène est bien compris à l'heure actuelle : le rythme des crises est déterminé par les changements périodiques de la susceptibilité des patients. Ces changements sont eux-mêmes en corrélation avec les rythmes de taux de sécrétion de cortisol et de catécholamines et avec le rythme de susceptibilité de bronchoconstriction alvéolaire.

Les RC représentent donc une dimension temporelle qui ouvre des perspectives nouvelles, déjà exploitées en Médecine (en France, grâce en particulier aux travaux de l'équipe du Dr Reinberg) et que trois exemples, choisis parmi un nombre de plus en plus élevé, nous permettront d'illustrer.

L'anesthésie locale classique produite par la lidocaïne, utilisée par les dentistes, assure l'insensibilité pendant 50 mi lorsqu'elle est appliquée à 15 h environ alors que cette durée est réduite à 20 mi à 7 h du matin.

L'utilisation de corticostéroïdes induit l'inhibition de la sécrétion d'ACTH lorsqu'ils sont prescrits en doses égales réparties dans la journée. La teneur en cortisol sanguin baisse et le RC en est perturbé.

Les malades en souffrent. Par contre si les corticostéroïdes sont administrés selon un «timing», résultant d'une étude chronobiologique, en deux doses inégales à des moments particuliers, l'activité des surrénales n'est pas inhibée, les RC ne sont pas désynchronisés. Le traitement peut être poursuivi sans effets secondaires.

Le dernier exemple touche à la fois à la «chronothérapie» et à la différenciation ou plutôt la perte du contrôle de celle-ci. Les chercheurs du groupe de Haus en Arkansas, après avoir injecté un nombre défini de cellules leucémiques à des souris de souche connue, ont examiné les effets de deux types de traitement à l'arabinosyl cytosine, agent mitostatique toxique. Dans les deux types de traitements, ils réalisent 4 séries de 8 injections par jour, les séries étant séparées par 3 jours d'intervalle. Dans le traitement de référence, les doses sont égales tandis que dans le traitement «sinusoïdal», une dose plus forte est donnée au moment du pic du RC de résistance à la drogue, les doses variant de 67.5 à 7.5 mg par g de poids corporel. Les résultats, qui incluent une létalité précoce montrent qu'à long terme, la durée moyenne de survie des souris ayant subi le traitement sinusoïdal est le double de ce qu'elle est pour les souris ayant eu le traitement de référence. Au terme de l'expérience, un grand nombre des premières peuvent même être considérées comme guéries.

Ce qui est remarquable, c'est que les cellules, qu'elles constituent un tissu ou qu'elles soient des organismes unicellulaires, présentent quantité d'activité rythmées de synthèse ou de dégradation, quantité de formes moléculaires périodiquement activées à des taux variables : les RC se situent au niveau cellulaire. Et pourtant la compréhension du mécanisme qui les engendre nous échappe à l'heure actuelle. La solution à cette question de Biologie fondamentale aura inévitablement des retombées pratiques. Celles-ci pourraient même dépasser le domaine des rythmes ; comme il apparaîtra à la lumière de nos résultats et comme le dernier exemple ci-dessus peut le suggérer, il est probable qu'elles auront des implications dans la compréhension de la différenciation.

L'intérêt de l'explication des RC fait comprendre la nécessité d'une approche moléculaire de ces problèmes. On trouvera, dans les pages qui suivent, une synthèse des cinq dernière années de travaux que le Département de Biologie Moléculaire leur a consacrées.

Dans la compréhension du mécanisme des RC, un certain nombre de données ont été acquises, par exemple l'importance du noyau. La

synthèse d'une protéine particulière, résultat logique de l'activité nucléaire (un gène contrôle la synthèse d'une protéine par l'intermédiaire d'un RNA messenger) n'est pourtant qu'une hypothèse à l'encontre de laquelle vont un certain nombre d'arguments. Dans la première partie de notre article, nous passons brièvement en revue les faits expérimentaux d'ordre général sur lesquels se fonde l'étude actuelle des rythmes. De nombreux renseignements ont été apportés par les organismes unicellulaires, en particulier *Acetabularia*, algue verte, – notre matériel expérimental –. Puisque, des données de la littérature, il apparaît de plus en plus clairement que les membranes ont un rôle à jouer dans le mécanisme des RC, nous nous sommes attachées à leur étude. Nous avons examiné les variations circadiennes qu'elles présentent et avons étudié les relations qui existent entre les rythmes des membranes spécialisées des chloroplastes, de la photosynthèse et de la synthèse des polysaccharides en analysant les effets d'un régulateur de croissance, l'auxine, et d'un de ses inhibiteurs compétitifs.

Dans la deuxième partie, nous exposons nos résultats récents qui suggèrent un rôle de l'organisation temporelle (au moins de moyenne fréquence) dans le déroulement de la morphogénèse.

DÉFINITION ET PROPRIÉTÉS DES RYTHMES CIRCADIENS

Les rythmes circadiens (RC) ont une période d'environ un jour. Quatre propriétés essentielles les caractérisent.

1) *L'endogénicité*. Les RC font partie de notre organisation biologique : ils sont endogènes et ne constituent pas de simples réponses aux signaux du monde extérieur. En effet, ils persistent en conditions constantes avec une période propre à l'espèce, proche mais un peu différente de 24 h (en général entre 23 et 25 h) et déterminée pour tout ensemble de conditions. Cette période est caractéristique de l'espèce ; elle est dite « naturelle » ; elle est inscrite dans notre patrimoine héréditaire. La fig. 1 rappelle les paramètres des oscillations périodiques ; les limites de confiance doivent être établies pour chaque valeur paramétrique.

2) *La stabilité de la période*. La période est remarquablement peu sensible aux variations du milieu : ses modifications ne sont que très faibles quand la température, l'intensité lumineuse, le niveau alimentaire ou autres facteurs varient dans de grandes proportions. Les légères variations de période sont reproductibles et de sens déterminé.

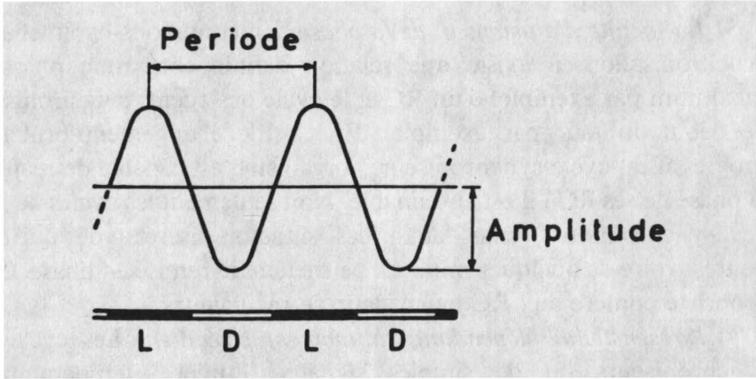


FIGURE 1.(a).- Les paramètres d'une oscillation : la période, τ , l'amplitude, C , la ligne de base, C_0 . La phase, Φ , exprime l'état de l'oscillation par rapport à une référence externe ou interne au système.

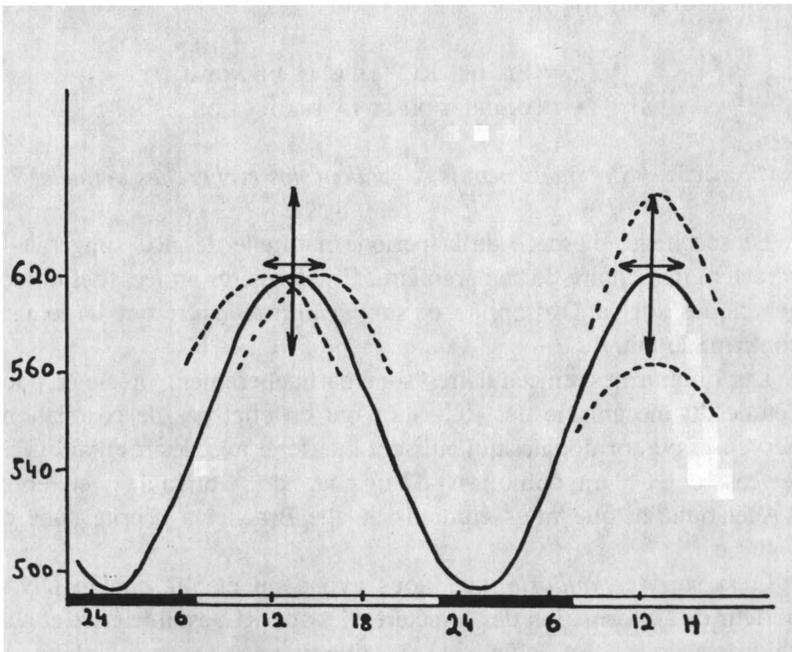


FIGURE 1(b).- Schéma (d'après Reinberg), montrant comment les limites de confiance affectent la phase (et la période) et l'amplitude d'un rythme.

3) *La faculté d'ajustement de la phase.* En conditions habituelles de synchronisation, il existe une relation définie entre une phase (le maximum par exemple) d'un RC et le cycle des agents synchroniseurs (le début du jour par exemple). En cas de changement brutal ou progressif du cycle synchroniseur, l'organisme est capable de réajuster la phase de ses RC : il est entraînable. Non seulement les cycles de 24 h des synchroniseurs, mais aussi des signaux discrets, de quelques heures, voire de quelques minutes, permettent la remise en phase. Cette propriété confère aux RC leur valeur de régulateur.

4) *La sensibilité dépendant du moment circadien.* Les cycles de synchroniseurs ou de simples signaux (lumière, température ...) peuvent entraîner les RC, mais un signal n'a pas le même effet aux différents moments du jour : il peut produire une avance de phase ou un retard de phase de grande ou de faible importance selon le moment du cycle où il est perçu. Il en résulte des «courbes de réponse de phase» où l'on porte en ordonnée le sens et la valeur du déphasage et en abscisse le moment du jour (fig. 2).

MÉCANISME DES RC : LE RÔLE DE NOYAU, LA TRANSCRIPTION ET LA TRADUCTION

1^{ère} partie.— *Sur quels acquis se fondent nos recherches actuelles ?*

La spécificité d'espèce de la période naturelle des RC suggérait le caractère héréditaire de ce paramètre. Ces dernières années, des études génétiques sur la *Drosophila* et sur *Chlamydomonas* ont largement confirmé le fait.

Les organismes unicellulaires sont particulièrement précieux pour l'étude du mécanisme des RC ; ils n'ont en effet pas de corrélations nerveuses ou hormonales qui puissent interférer avec les résultats. C'est le cas de *Chlamydomonas*, d'*Euglena*, de *Gonyaulax* et enfin d'*Acetabularia*, que nous étudions et que Brachet a décrite dans ce volume.

C'est sur *Acetabularia* que nous avons pu établir que le DNA, porteur de l'information des caractères liés aux RC, est nucléaire et non chloroplastique. En effet, (1) l'actinomycine D, qui inhibe la transcription des DNA nucléaire et chloroplastique, inhibe les RC des *Acetabularia* entières mais non des *Acetabularia* anucléées. (2) La rifampicine, inhibiteur spécifique de la transcription bactérienne et

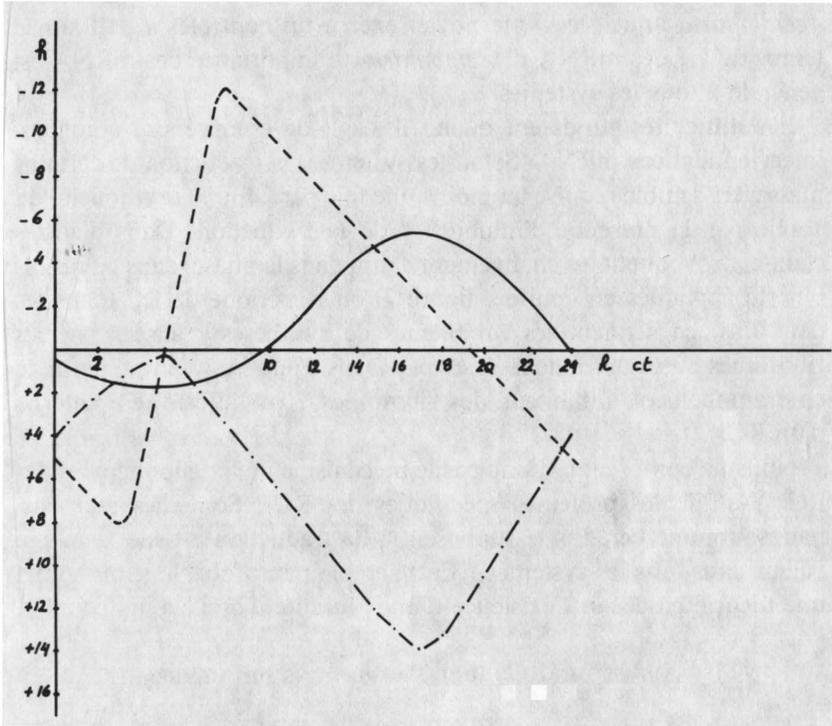


FIGURE 2.— Courbes de réponse de phase du RC de photosynthèse d'*Acetabularia* isolées, étudiées grâce à l'appareillage très sensible mis au point dans le Laboratoire Max-Planck de Biologie cellulaire dirigé par le Pr. H. G. Schweiger. Les algues sont maintenues en conditions constantes et lumière continue et sont soumises à des pulses de 6 h d'obscurité (trait discontinu), de 8 h de cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique (points-tirets) et de 4 h d'auxine (IAA, 10^{-4} M) (trait plein).

chloroplastique est sans effet sur le RC de photosynthèse d'*Acetabularia* alors que la synthèse de RNA est tombée à quelques pourcents de la valeur des témoins. (3) Les greffes de fragments d'algues réalisées entre deux souches d'*Acetabularia*, l'une dotée de rythmicité et l'autre ayant perdu cette propriété ne présentent de RC que si elles possèdent un noyau provenant de la souche sauvage, dotée de rythmicité. (4) l'amplitude du RC est accrue quand la synthèse de RNA nucléaire est stimulée. La transcription est toujours requise pour l'expression des rythmes, bien que les mRNA puissent avoir un temps de vie très différent selon les systèmes (il peut aller jusqu'à 40 jours chez les

Acetabularia anucléées) ; le noyau exerce un contrôle négatif sur le temps de vie des mRNA d'*Acetabularia*. L'importance des mRNA est générale à tous les systèmes.

Les difficultés surgissent quand il s'agit de comprendre comment interviennent ces mRNA. Selon les systèmes, la traduction de certains messagers semble requise au moins une fois par 24 h. : la rythmicité est abolie par la présence d'inhibiteurs de la traduction. Dans d'autres ceux-ci provoquent un changement défini dans la phase (dans ce cas, ils ont été appliqués en «pulse», figure 2) ou la période de RC (dans les deux cas, ce seraient les inhibiteurs de synthèses réalisées par les ribosomes 80 s qui seraient efficaces). Dans d'autres systèmes, enfin, le chloramphénicol, inhibiteur des ribosomes 70 s, affecte le «pattern» d'un RC.

Nous ne comprenons donc pas le mécanisme de fonctionnement des RC. Y-a-t-il des protéines spécifiques des RC ? Sont-elles membranaires, comme certains le supposent ? La traduction a-t-elle la même valeur dans tous les systèmes ? Ceci semble peu probable si on admet une théorie basée sur l'existence d'une pluralité d'oscillateurs couplés.

MÉCANISMES DES RC : (a) LES VARIATIONS DES MEMBRANES

Au cours de la dernière décennie, la constitution des membranes a été élucidée et on leur connaît des fonctions de plus en plus nombreuses, comme le contrôle des mitoses, l'activation de kinases qui déclenchent une cascade d'évènements ...

Propriété de la plus haute importance, les membranes sont dynamiques. Sont-elles variables de manière prévisible au cours du cycle circadien ? Nous avons cherché à répondre à cette question en étudiant la photosynthèse, résultat immédiat de l'activité des thylacoïdes, membranes spécialisées dans la récolte de l'énergie solaire et sa transformation en énergie chimique grâce à deux photosystèmes (PS) fonctionnant en série.

Le RC de la photosynthèse et les thylacoïdes

Le RC de la photosynthèse a une grande amplitude chez *Acetabularia* : le taux de la photosynthèse passe du simple au double ou au triple (selon les expériences) entre le minimum et le maximum de l'oscillation. La question se posait aux biologistes moléculaires de savoir ce qui correspond physiquement à cette variation. La

photosynthèse est par essence un phénomène membranaire puisque les thylacoïdes en sont responsables (fig. 3).

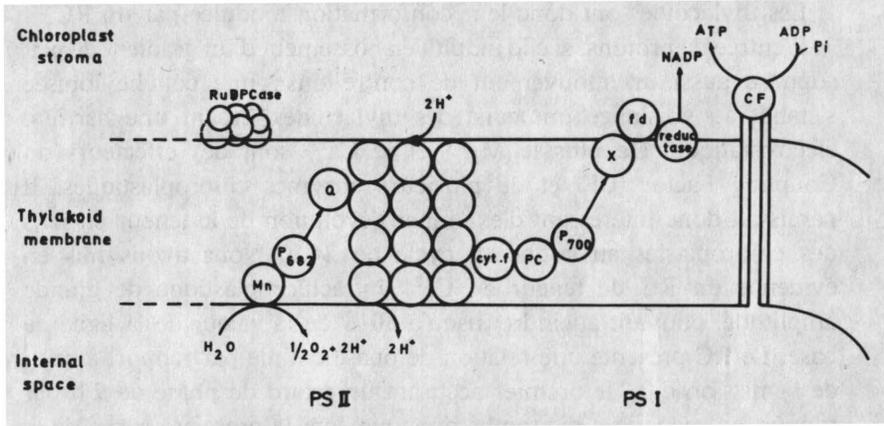


FIGURE 3.— Un thylacoïde est un saccule membranaire intrachloroplastique. Il est constitué de pigments chlorophylliens (dont les formes «piège de l'énergie photique», le Pigment 682 et le Pigment 700, formes de la chlorophylle a), des composants des deux photosystèmes (PS) I et II, et de certains enzymes comme la ribulose bisphosphocarbonylase (RuBPCase). Grâce à l'énergie photique, le P₆₈₂ est activé et arrache un électron à une molécule d'eau. Celle-ci est décomposée en $1/2 O_2 + 2 H^+$. L'accepteur primaire énergisé libère ensuite un électron qui passe dans le pool des quinones. Celles-ci transfèrent les électrons en même temps que des H^+ prélevés à l'extérieur des thylacoïdes ; les électrons vont au cytochrome et à la chaîne de transporteurs ; les H^+ sont libérés dans l'espace intra-thylacoïdien. Le PS I photoactivé prend en charge un électron qui réduira finalement le NADP du côté extérieur au thylacoïde. L'acte primaire de la photosynthèse permet donc la formation simultanée de NADPH et d'un gradient de pH au travers du thylacoïde. Ce gradient permet le fonctionnement du Coupling Factor (CF), ATPase chloroplastique, dans le sens de la synthèse d'ATP. La RuBPCase est le premier enzyme du cycle de Benson-Calvin. Il permet la fixation de CO_2 dans un composé organique.

Nous avons montré que le rythme bien connu de dégagement d' O_2 est en corrélation avec une variation du taux de la réaction de Hill. Celle-ci implique un fragment de thylacoïde puisqu'elle mesure *in vitro* le passage des électrons du PS II au PS I et la réduction d'un accepteur substitué au NADP, l'accepteur naturel.

Sironval, à Liège, ayant mis au point une méthode d'analyse directe de l'état des thylacoïdes, nous avons entrepris avec lui d'examiner les chloroplastes d'*Acetabularia* et nous avons mis en évidence la corrélation entre le dégagement d' O_2 à 2 moments du cycle de 24 h et la conformation des thylacoïdes : les spectres de fluorescence d'émission à

– 196°C sont différents ; les différences, petites mais reproductibles, sont amplifiées par une succession de passages de + 20° à –196°.

Les thylacoïdes ont donc leur conformation modulée par un RC.

L'entrée de protons, si elle induit l'établissement d'un gradient de pH, suppose aussi un mouvement de contre-ions ; une couche ionisée s'établit au voisinage immédiat des thylacoïdes, créant une barrière électrostatique. De plus le Mg^{2+} et le Ca^{2+} sont des effecteurs du Coupling Factor (CF) et de plusieurs enzymes chloroplastiques. Il paraissait donc intéressant d'examiner l'évolution de la teneur en ions des chloroplastes au cours du cycle de 24 h. Nous avons mis en évidence un RC de teneur en Ca^{2+} intrachloroplastique de grande amplitude, pouvant atteindre jusqu'à 50% de la valeur de la ligne de base. Le RC présente une relation de phase définie par rapport à celui de l'émission d' O_2 , le premier accusant un retard de phase de 9 h par rapport au second (le pic tombe donc pendant la première partie de la phase sombre). La teneur en Mg^{2+} pourrait osciller en phase avec le Ca^{2+} , mais avec une moindre amplitude.

Le K^+ ne présente pas d'oscillation circadienne de teneur, mais des fluctuations de haute fréquence de période variable de l'ordre de 5 à 10 mi et d'une amplitude de 20 à 25%.

Le fonctionnement des thylacoïdes est clairement modulé par la rythmicité circadienne. La conformation et les taux d'activité de ces membranes varient selon le moment du jour (dans tous les cas, le maintien des variations en conditions constantes a été éprouvé).

L'étude détaillée de la variation circadienne de teneur en ATP chloroplastique est en cours, mais l'analyse de fluctuations de haute fréquence de cette teneur s'est révélée pleine d'intérêt. En collaboration avec le Prof. De Prins (Laboratoire des Etalons de fréquence de l'ULB), nous avons en effet trouvé que la teneur en ATP chloroplastique est l'objet de fluctuations aléatoires de période de 2 à 4 mi et d'amplitude maximale de 25%. L'analyse spectrale des données n'a pas permis de détecter d'oscillation de période comprise entre 1 et 10 mi, mais une variance mobile, calculée sur les séries de six dosages consécutifs, a montré une variation de grande amplitude (50 à 100%) et de période de 20 ou 30 mi selon les expériences. Une telle variation pourrait refléter l'existence de phénomènes coopératifs. Les fluctuations en teneur en ATP et en K^+ montrent la flexibilité de certains points de contrôle, permettant des ajustements rapides en plus de la modulation circadienne.

Puisque les thylacoïdes varient selon le moment du cycle de 24h et puisqu'il en va de même de la réaction de Hill, qui implique un fragment de thylacoïde, la question se posait de savoir si les centres réactionnels des deux photosystèmes présentaient aussi des changements circadiens de taux d'activité. Nous avons trouvé que ceux-ci ne varient guère selon le moment du jour. Cependant les résultats sont très variables d'une expérience à l'autre et l'activité des 2 PS en série est particulièrement basse dans *Acetabularia* pour des raisons qui ne sont pas claires. Puisque nous avons contrôlé qu'une partie des molécules d'auxine (IAA, acide β - indole acétique) et de morphactines exogènes pénètre dans les thylacoïdes et s'y fixe, nous avons entrepris d'étudier les effets de ces substances sur les taux d'activité individuels des deux PS à différents moment du cycle circadien. L'IAA augmente et les morphactines diminuent le taux d'activité du PS II. Cependant, il n'y a pas d'effet du moment de la journée. Ces mêmes substances n'affectent que légèrement le taux d'activité du PSI. Un mélange équimolaire d'IAA et de morphactines donne des valeurs intermédiaires. On en déduit donc que la membrane thylacoïde, assurant le couplage des diverses réactions claires, est requise pour l'expression des effets différenciées (selon le moment du jour) de l'IAA et des morphactines sur la rythmicité ; à un degré moindre d'organisation, ces effets différentiels disparaissent. D'où l'hypothèse que nous formulons, que cette membrane constitue la structure qui varie selon le cycle de 24 h, assure un spill-over ⁽¹⁾ variable et rend compte du RC de photosynthèse.

Elle constituerait donc le support du RC de la photosynthèse d'*Acetabularia*.

Les rythmes circadiens des teneurs en acides gras

Nous avons entrepris, en collaboration avec le Dr Jerebzooff de Toulouse, d'étudier la composition en acides gras des algues entières et

⁽¹⁾ Spill over : Littéralement fuite de l'énergie (du PS II, le PS I pouvant la récupérer). Par extension, mécanisme par lequel les chloroplastes sont capables d'assurer la régulation de l'utilisation de l'énergie recueillie entre les deux PS de manière à obtenir le meilleur rendement photosynthétique. Lorsque le PS II ne peut pas utiliser efficacement toute l'énergie qu'il a récoltée, l'énergie en excès s'échappe des chlorophylles a du PS II et est récupérée par les chlorophylles a du PS I. Ce phénomène requiert la présence de Mg^{2+} et dépend de la distance entre les centres réactionnels des deux PS.

des chloroplastes ; dans une telle analyse, les acides gras membranaires prédominent largement. Nous avons suivi l'évolution temporelle de cette composition au cours du cycle de 24 h.

Les acides gras peuvent être groupés en 5 pools : 2 pools d'acides gras saturés, palmitiques C 16 : 0, et stéariques C 18 : 0 ; 3 pools d'acides gras insaturés, palmitoléiques C 16 : 1, oléiques C 18 : 1 et polyinsaturés en C 18 (linoléiques C 18 : 2, linoléiques C 18 : 3 et enfin les acides en C 18 : 4).

Les acides gras totaux présentent un RC de grande amplitude. Le pic se situe en phase claire, à 8-10 h environ. Il peut être suivi par un pic secondaire, en phase sombre, entre 15 et 19 h. Leurs amplitudes respectives sont de 300 et de 50% de la ligne de base.

Examinant les pools individuels d'acides gras, les points suivants apparaissent. Les acides en C 18 : 0 ont toujours une teneur faible et ne présentent jamais de RC.

Les autres pools oscillent selon un RC. Toujours, l'acide oléique présente un énorme pic tombant entre 8 et 10 h (selon les expériences). Le pic est très étroit. Les acides gras en C 16 saturés et insaturés évoluent de manière synchrone ainsi en général que les acides gras insaturés en C 18, dont le pic peut être soit en phase avec celui des C 16, soit un peu en retard.

Les acides gras chloroplastiques présentent des différences par rapport aux algues entières : (1) il n'y a jamais de pic secondaire en phase obscure, (2) la teneur en acides gras polyinsaturés est particulièrement élevée (25% contre 18% chez les algues entières), (3) le pic majeur est celui des acides gras en C 16 : 0.

Ces résultats suggèrent que la composition en lipides membranaires est sujette, elle aussi, à modulation circadienne.

(b) LE RÔLE DES MEMBRANES

Pour tenter de déchiffrer le mode de fonctionnement des membranes dans les RC, on est conduit à se demander si la fixation d'une hormone à un site membranaire (la membrane en est dès lors modifiée) affecte un RC.

Le préalable à une telle expérience consiste à démontrer qu'*Acetabularia* contient de l'auxine, l'acide β -indole acétique, (IAA), ce que nous avons réalisé il y a quelque temps. Son antagoniste, les morphactines (fluorenols de synthèse diversement substitués) inhibent le développe-

ment d'*Acetabularia*. L'IAA radioactif se retrouve dans les fractions chloroplastique et non chloroplastique ; la quantité de marquage des deux fractions est diminuée en présence de morphactines.

Nous avons cherché à répondre à la question de savoir si l'IAA et les morphactines affectent-elles les RC.

Effets de l'IAA sur le RC de photosynthèse d'Acetabularia

Une des meilleures manières d'éprouver l'effet d'une substance sur un rythme est d'en donner un «pulse» pendant un temps limité et d'examiner la phase ultérieure de l'oscillation. *Acetabularia* présente certains désavantages pour ce genre d'étude. En effet, le RC de photosynthèse (par exemple) d'une algue est affecté par deux types de variabilité : une variabilité (importante) entre individus et une variabilité (d'importance égale à la première) entre périodes de cycles successifs. Dans ce cas, il faut disposer d'un moyen de mesure assez sensible pour quantifier le dégagement d'O₂ d'une algue isolée. Il nous a été possible de réaliser ces expériences à l'Institut Max-Planck à Wilhemshaven (actuellement à Ladenburg-Heidelberg). Elles ont montré que l'IAA provoque des avances de phases, du moins à certains moments du cycle de 24 h. *Acetabularia* présente en effet une phase insensible à l'IAA et une phase sensible ; cette dernière va de 11 à 22 h environ.

Réponse du RC de photosynthèse d'Acetabularia aux régulateurs de croissance

La technique du pulse n'est pas la seule manière d'étudier l'effet d'une substance sur un RC. Les autres techniques utilisent des «steps» ou examinent la «responsiveness» ou sensibilité du système, techniques que nous allons définir ci-après. Notons immédiatement que le choix doit être dicté par le matériel expérimental (on ne peut pas mettre l'homme en libre-cours pour connaître l'effet d'une drogue !) ou par les techniques de mesure (qui imposent des limites de temps entre les points expérimentaux). En collaboration avec J. De Prins, nous avons comparé les réponses des algues à une substance biologiquement active appliquée de trois manières différentes : (1) les pulses (l'agent est imposé pendant un temps \pm bref), (2) les «steps» (l'agent introduit dans le milieu y reste) et (3) la sensibilité du système (exprimée par sa «responsiveness»), c'est-à-dire la réponse immédiate à l'agent. Dans tous les cas, on tient compte du moment (ct, circadian time) auquel la

substance est introduite dans le milieu ou l'agent imposé au système circadien. Dans les deux premiers cas, on mesure la phase, l'amplitude et la ligne de base de l'oscillation en libre-cours pendant le ou les deux cycles suivants. Le pulse convient pour préciser la phase sensible. Dans la troisième technique (responsiveness), on mesure la valeur immédiatement atteinte par la fonction ; cette mesure répétée tout au long de l'oscillation donne la courbe de «chronosusceptibilité». Nos expériences en cours suggèrent que les trois méthodes donnent des résultats très comparables. Cependant il n'est pas certain que ces résultats puissent être généralisés, car *Acetabularia* présente une phase de sensibilité et une phase d'insensibilité aux régulateurs de croissance et répond par des déphasages unidirectionnels.

Effets des morphactines sur le RC de photosynthèse

Nous avons mis au point, en collaboration avec J. L. Guisset, du Laboratoire des Etalons de fréquence, une méthode d'enregistrement des données par microprocesseur (plaquette 6800 munie de ses entrées et sorties digitales et analogiques) qui nous permet de connaître rapidement et à intervalles de 15 mi l'évolution du dégagement d'O₂.

Nous avons constaté que l'effet des morphactines sur la photosynthèse diffère selon l'intensité lumineuse utilisée : 5000 lux ou 1800-2000 lux (en culture, les algues sont sous 1000-1200 lux). Après une phase sombre, la courbe ascendante reflétant le RC de photosynthèse présente un coefficient angulaire d'autant plus élevé que l'intensité lumineuse augmente. Il en résulte une asymétrie marquée de la courbe. Cette asymétrie disparaît après 1 ou 2 cycles en LL⁽²⁾. En présence de morphactines, les algues font une photosynthèse dont la courbe n'est pas asymétrique, même à une intensité lumineuse supérieure à 1800 lux.

Les morphactines exercent sur la photosynthèse un effet inhibiteur dépendant de la phase du RC lorsque l'intensité lumineuse est élevée (5500-1800 lux) : l'inhibition est plus marquée pendant la seconde moitié de la phase sombre subjective que peu après l'acrophase. Mais à faible intensité lumineuse (1200-1500 lux), l'effet inhibiteur des morphactines est beaucoup moins accentué. Il est possible qu'il y ait une avance de phase. Ce point est encore à l'étude. Les algues anucléées

⁽²⁾ LL, lumière continue. LD, alternance de lumière et d'obscurité.

répondent de la même manière aux morphactines que les algues entières.

Le RC de la synthèse des polysaccharides

Nous avons préalablement établi l'existence d'un RC de teneur en polysaccharides chloroplastiques chez *Acetabularia*. Nous avons étudié leur synthèse en examinant par autoradiographie l'évolution du taux de fixation du fructose dans les polysaccharides au cours du cycle de 24 h. Un RC de grande amplitude est observé, dont la phase diffère de moins d'une heure de celle de la teneur en polysaccharides. Le RC se maintient en LL, pratiquement sans diminution d'amplitude.

Nous avons retrouvé le gradient apico-basal d'activité physiologique caractéristique d'*Acetabularia* : ces chloroplastes apicaux sont les plus jeunes des chloroplastes de l'algue et ils incorporent le plus activement le fructose dans les polysaccharides ; ceux du siphon sont «adultes» et sont un peu moins actifs que les précédents et ceux du rhizoïde sont transformés en organes de réserve très peu actifs. Les chloroplastes apicaux et ceux du siphon diffèrent donc légèrement entre eux par le niveau de la ligne de base du RC des polysaccharides de synthèse (fig. 4a) : par contre l'amplitude du rythme est un peu plus grande dans les seconds que dans les premiers. Ce rythme ne semble pas exprimé par les chloroplastes du rhizoïde.

Nous avons éprouvé, sur ce RC, les effets des morphactines dont nous savons qu'une fraction se fixe sur les chloroplastes. Nous avons observé un déphasage spectaculaire (de 180°) du pic de synthèse en analysant la réponse immédiate du système («responsiveness») : les algues subissent un traitement de 2 h avant l'incorporation (30 mi.) et la fixation pour autoradiographie (fig. 4b). Dans ces expériences, nous avons également étudié la façon dont le traitement «s'imprime», dans le système et il est apparu que, pour *Acetabularia* la réponse est la même, que le traitement soit imposé immédiatement avant l'incorporation ou soit suivi de 24 h en milieu sans morphactines (en LL) avant l'incorporation.

Ces expériences ouvrent la voie à une série de recherches. En particulier, jusqu'à quel point la photosynthèse et la synthèse des polysaccharides sont-elles liées ? il est, en effet, très difficile (sinon irréalisable) d'amener les chloroplastes à réaliser la synthèse des polysaccharides quand la photosynthèse est bloquée. Celle-ci peut-être

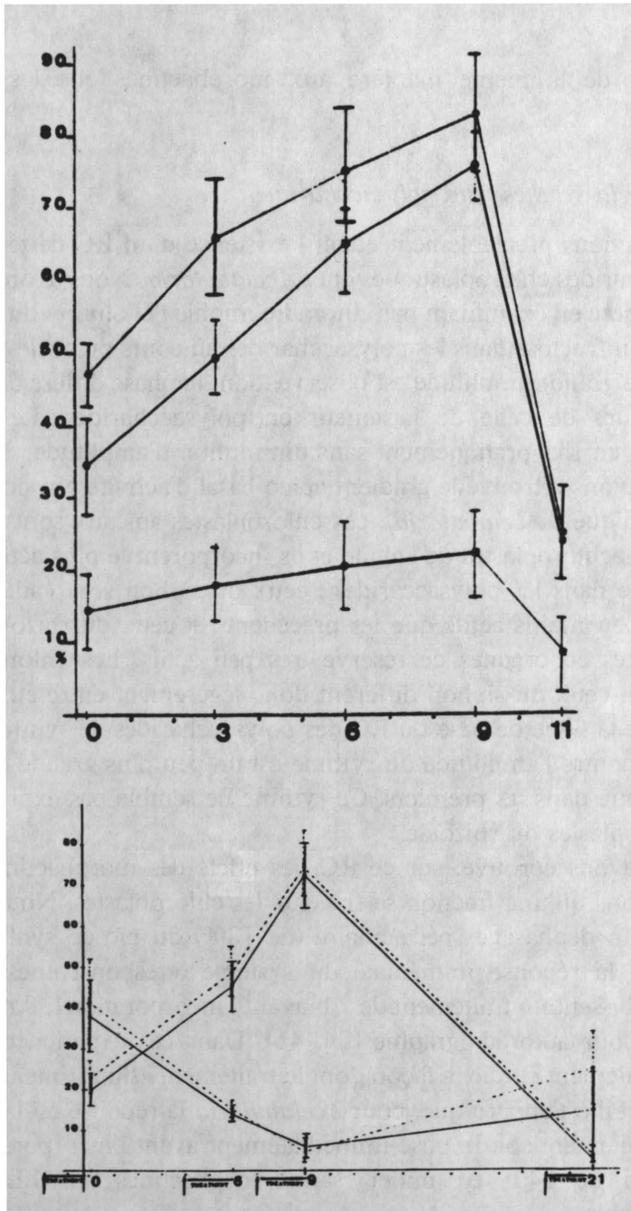
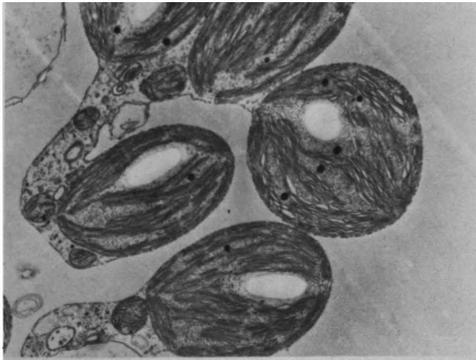
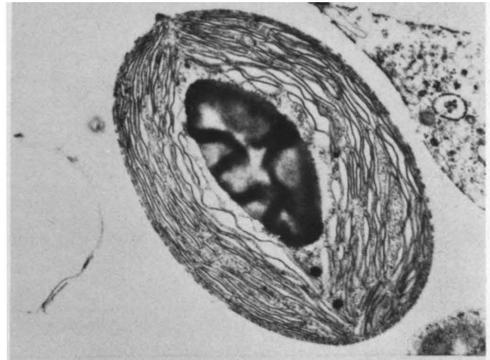


FIGURE 4.— Rythme circadien de synthèse des polysaccharides chloroplastiques et effet immédiat des morphactines, inhibiteurs compétitifs de l'IAA. Fig. supérieure : % de chloroplastes ayant incorporé du ¹⁴C-fructose en 30 mi. Les 3 courbes représentent respectivement les chloroplastes apicaux (courbe du haut de la fig.), les chloroplastes du siphon (courbe du milieu) et les chloroplastes du rhizoïde (courbe du bas de la fig.). Fig. inférieure : effet d'un traitement de 2 h par les morphactines, traitement donné immédiatement avant les 30 mi d'incorporation. A 9 h, les courbes des algues témoins présentent un pic et celles des algues traitées, un minimum. En trait plein, en conditions habituelles d'alternance de lumière et d'obscurité. En trait pointillé, en lumière continue (reproduit de *Developmental Biology of Acetabularia*, 1979, avec la permission d'Elsevier (North Holland)).



Controls at ct 0



Controls at ct 6



IAA-treated algae at ct 0

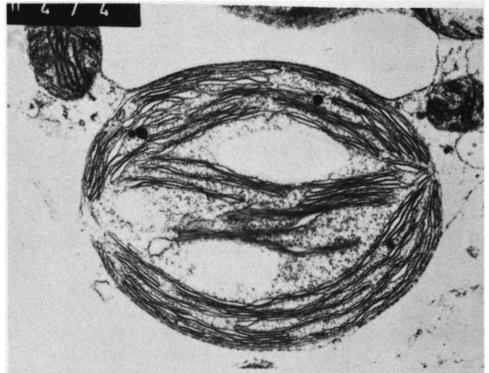


IAA-treated algae at ct 6

FIGURE 5.— Effets de l'IAA et des morphactines à deux moments du cycle de 24 h (à 0 et à 6 h «circadian time» c-à-d au début et au milieu de la phase claire ou de la phase



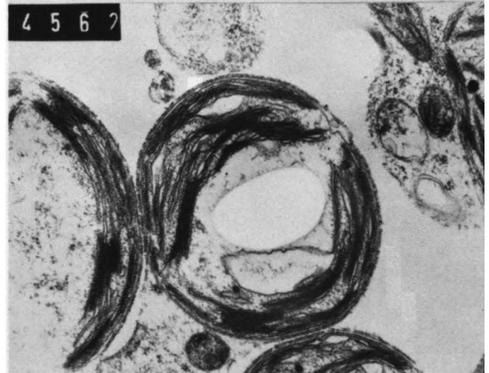
Controls at ct 0



Controls at ct 6



Morphactin-treated algae at ct 0



Morphactin-treated algae at ct 6

claire subjective en lumière constante). Les algues traitées à l'IAA et leurs témoins sont en lumière constante ; celles traitées aux morphactines et leurs témoins sont en alternance L-D.

bloquée, notamment, par le DCMU, inhibiteur du transfert d'électrons entre le PSI et le PSII, mais dans ces conditions la synthèse des polysaccharides est totalement inhibée. Il faut donc jouer sur le caractère différentiel des effets de certaines substances sur ces deux synthèses. De telles expériences ont été entreprises. Nous espérons qu'elles montreront si les oscillations de la photosynthèse sont à elles seules responsables de celles de la synthèse des polysaccharides.

Effets comparées de l'IAA et des morphactines sur l'ultrastructure des chloroplastes et sur la performance des organites

Nous avons étudié les effets de l'IAA sur l'ultrastructure des chloroplastes. L'auxine est donnée en pulse de 6 à 8 h. Les algues sont ensuite transférées en lumière constante pendant 2 cycles, puis fixées à 4 moments différents. Les résultats sont déjà acquis pour 2 d'entre-eux, 0 et 6 h. Nous avons comparé ces données à celles d'une expérience où nous avons donné un «STEP» de morphactines au milieu de la phase claire et fixé les algues à 0 et 6 h après 3 cycles en alternance de lumière et d'obscurité. Nous voulions voir jusqu'à quel point ces substances antagonistes avaient des effets opposés sur l'ultrastructure et éventuellement mettre celle-ci en rapport avec les taux de photosynthèse et de synthèse de polysaccharides. Préalablement, nous avons précisé quelles différences apparaissaient entre les algues maintenues en LD et celles placées en LL.

L'examen des micrographies électroniques (fig. 5) montrent que :

- (1) l'ultrastructure reflète les perturbations induites par les 2 substances.
- (2) Les morphactines exercent un effet général sur l'ultrastructure (une diminution de la largeur des thylacoïdes) ; l'IAA par contre n'exerce pas d'effet général, spécifique et observable tant à 0 qu'à 6 h (rappelons que les premières sont des substances de synthèse tandis que l'IAA est «naturel»).
- (3) Tous les effets des morphactines et ceux de l'IAA varient selon le moment du jour. Il faut donc tenir compte du temps circadien dans toute analyse ultrastructurale.
- (4) Il n'y a pas de corrélation directe entre l'ultrastructure et les taux de photosynthèse et de synthèse des polysaccharides des *Acetabularia* dans ces conditions et à ces moments particuliers.

LES MEMBRANES ET LES RC : CONCLUSIONS

Les membranes subissent des changements conformationnels au cours du cycle de 24 h comme en attestent les variations des propriétés des thylacoïdes et de leur aspect ultrastructural. Les compositions en acides gras totaux et chloroplastiques-concernant dans une large mesure les lipides membranaires – présentent un RC.

Les teneurs en ions chloroplastiques dépendent d'une part de l'activité membranaire et d'autre part l'influencent par rétro-contrôle. La concentration en ions Ca^{2+} (et peut-être Mg^{2+}) varie selon un RC. La concentration en ions K^+ ne présente que des fluctuations de haute fréquence tout comme la teneur en ATP chloroplastique. La variance des fluctuations de cette dernière est périodique.

L'IAA et ses antagonistes (les morphactines) affectent l'une et l'autre la photosynthèse, différemment selon le moment du jour, pour autant qu'un fragment minimum de thylacoïde soit présent : celui-ci doit inclure les centres réactionnels des deux photosystèmes. Ces expériences suggèrent que le thylacoïde est le support physique du RC de la photosynthèse.

L'IAA et les morphactines exercent aussi l'une et l'autre des effets différentiels, selon le moment du jour, sur la synthèse des polysaccharides. Puisque ces substances se lient au plasmalemme et aux membranes chloroplastiques, leurs effets s'inscrivent bien dans l'hypothèse selon laquelle les membranes ont une fonction importante dans le mécanisme de la rythmicité circadienne.

2^{me} partie.

RYTHMES CIRCADIENS ET DÉVELOPPEMENT MORPHOGÉNÉTIQUE D'ACETABULARIA

INTRODUCTION

Acetabularia semble être une plante «indifférente» à la longueur relative du jour et de la nuit. Pour que se développe le chapeau reproducteur, il suffit que l'algue ait une intensité lumineuse suffisamment élevée comportant une certaine quantité de radiation

bleue. Ce qui ne veut pas dire pour autant que la phase du cycle circadien pendant laquelle l'*Acetabularia* est exposée à la lumière soit sans influence sur les phénomènes impliqués dans la morphogénèse. Certains systèmes enzymatiques sont vraisemblablement activés, notamment ceux qui provoquent la transformation des parois qui, de nature mannosique devient cellulosique. D'autres systèmes enzymatiques voient leur taux d'activité subir une augmentation spectaculaire ; c'est le cas des enzymes intervenant dans la synthèse du DNA ; il faut savoir que le noyau unique d'*Acetabularia* va brutalement se diviser en 10^8 noyaux qui iront coloniser les loges du chapeau, ce qui implique une synthèse intensive de DNA. Par ailleurs, on sait qu'*Acetabularia* contient de l'auxine (IAA), que cette teneur augmente lors de la formation du chapeau et que l'inhibition du déplacement de l'hormone par les morphactines retarde la morphogénèse. Enfin, on pense que le métabolisme de l'auxine est contrôlé par la lumière.

Si le développement morphogénétique est influencé par le cycle photopériodique de l'environnement d'une part, et si les auxines jouent un rôle dans la régulation de la morphogénèse, d'autre part, des perturbations du cycle photopériodique ou de la teneur actuelle en régulateurs endogènes devraient affecter la morphogénèse (bien qu'elle ne s'exprime que plus tard). Nous avons observé des effets marqués et différentiels (selon le moment du cycle circadien) de telles perturbations. L'étude n'est pas terminée, mais elle pourrait fournir des informations utiles tant au plan pratique qu'au plan théorique. Aussi allons-nous exposer nos premières expériences de manière détaillée.

Comparaison de la croissance et du moment d'apparition des chapeaux d'algues témoins et d'algues transférées en phases inverse

(La phase est inverse à 1 h près : les *Acetabularia* passent d'une phase lumineuse qui s'étend de 9 à 21 h à une phase lumineuse qui va de 10 à 22 h).

Le but de ces expériences était de voir si le raccourcissement ou l'allongement de la photofraction affecte la morphogénèse (comme dans le cas du photopériodisme), ou mieux, si la lumière perçue en phase sombre par l'Acétabulaire (à cause de l'allongement de la phase claire) affecte sa morphogénèse et réciproquement, si l'obscurité imposée pendant la phase normalement claire de l'algue a un effet de ce type.

La croissance d'*Acetabularia* est peu affectée par un transfert opéré en pleine phase claire (à 6.5 ou à 7.5 h⁽³⁾) à la phase sombre. Par contre, la vitesse d'apparition des chapeaux est modifiée. Les algues transférées présentent une accélération de la formation des chapeaux après 3 semaines. Ensuite, la différence entre *Acetabularia* témoins et *Acetabularia* transférées tend à diminuer et s'annule après un mois et demi.

Nous avons comparé à des témoins des algues qui avaient été soumises à une inversion de phase soit en leur fournissant une double phase lumineuse (ce qui revient à opérer le transfert à 12 h) soit en leur fournissant une double phase sombre (ce qui revient à opérer le transfert à 0 h). Après 13 jours, nous observons un retard considérable d'apparition des chapeaux après des transferts opérés tant à 0 h qu'à 12 h. Le nombre des chapeaux est de l'ordre du quart chez les traités alors qu'il atteint déjà plus de 80 % chez les témoins.

Cette expérience avait été conduite à la fois chez des algues qui, au départ avaient 12 mm de long, et chez des algues beaucoup plus avancées dans leur développement morphogénétique et avaient 24 mm de long. Ces dernières n'ont pas été influencées par le transfert. Le «point de non retour» de leur cycle de développement avait été atteint.

Actuellement nous explorons systématiquement les effets du transfert d'algues jeunes d'une phase en phase inverse aux différents moments du cycle.

Effets du moment d'application de morphactines sur la morphogénèse d'Acetabularia

Sachant que les morphactines, substances de synthèse qui interfèrent avec le déplacement de l'auxine dans la cellule, retardent le développement de l'algue (ou en inhibent la morphogénèse à forte concentration), nous avons examiné l'influence que pourrait avoir le moment du début du traitement sur l'importance de leurs effets. Les lots d'*Acetabularia* ont été traités à différents moments du cycle de 24 h par les morphactines à la dose de 20 µg/ml. Celles-ci sont maintenues dans le milieu de culture pendant toute l'expérience. La croissance des

(³) Par convention, le début de la phase claire est compté temps 0 et les fractions d'heures ramenées au système décimal : on peut ainsi comparer les phases en alternance de lumière et d'obscurité (LD) et en libre-cours (lumière ou obscurité constantes, LL ou DD) où la période peut être différente de 24 h.

algues est comparable dans tous les lots, mais un effet plus ou moins important se marque sur la vitesse d'apparition du chapeau. A titre d'exemple, considérons une série expérimentale 26 et 35 jours après le début du traitement commencé à différents moments de la journée. Par rapport aux algues témoins, il n'y a que 6 % des algues traitées à 14 h qui aient développé un jeune chapeau après 26 jours : il y en a beaucoup plus, 48 % quand elles ont été traitées 2 h plus tard, à 16 h. Après 35 jours cependant, la différence tend à s'estomper (les morphactines retardent la formation du chapeau, mais ne l'inhibent pas dans ces conditions de concentration et de durée. De plus, le maximum d'inhibition glisse de 14 h vers la 2^e partie de la phase claire.

Le mécanisme de cette inhibition est-il le même que celui qui entre en jeu lors des transferts entre phases lumineuse et sombre à certains moments du cycle de 24 h ? En d'autres termes le mécanisme de l'inhibition provoquée par les morphactines, substances anti-IAA, et par une perturbation de phases de lumière et d'obscurité est-il le même ? Nous avons éprouvé cette possibilité en combinant traitement aux morphactines et transfert de la phase claire à la phase sombre à 7.5 h. Dans les deux expériences réalisées, nous observons une amplification des effets inhibiteurs décrits ci-dessus. Après 18 jours dans la première expérience et après 29 jours dans la deuxième, une remarquable inhibition (totale ou presque totale) se produit quand les traitements ont été appliqués au milieu de la phase sombre.

Effets du moment d'application de l'IAA sur la morphogénèse

Nous avons examiné les effets de l'IAA sur la morphogénèse d'*Acetabularia*, l'auxine (à la concentration de 10^{-5} M) étant appliquée à différents temps circadiens (le protocole de ces expériences est calqué sur celui utilisé pour les expériences avec les morphactines).

La croissance n'est guère modifiée par l'apport d'auxine exogène. Par contre, la morphogénèse des algues traitées est freinée par l'IAA lorsqu'on l'ajoute à 0 ou 22 h, et fortement accélérée lorsqu'on l'ajoute à 12 ou 14 h. Ultérieurement, cependant, les différences s'amenuisent. Dans deux autres expériences, nous avons étudié le moment d'apparition des premiers chapeaux et avons observé que l'IAA favorise différentiellement (selon l'heure à laquelle il a été introduit initialement dans le milieu) le moment d'apparition du chapeau : une accélération se marque à 12 h, voir plus tôt (7.5 et même 3 h). (tabl. 1).

TABLEAU 1.— Effets de l'IAA (10^{-5} M) sur le nombre de chapeaux qui apparaissent dans une population de 100 algues en fonction du moment auquel l'auxine a été introduite dans le milieu

Expér.	comptage	té	ct 0	ct 3	ct 7.5	ct 12	ct 14	ct 22
mai 80	13 ^e jour	8	16 (*)	56 (*)	48			
oct. 80	26 ^e jour	6	10	8	16	14	—	6
févr. 81	13 ^e jour	6	4	12	8	12	12	4
	21 ^e jour	56	36	58	52	64	72	36

(*) ct 0.5 au lieu de ct 0 et ct 3.5 au lieu de ct 3.

Conclusion concernant les RC et le développement morphogénétique

L'ensemble de ces résultats suggère que c'est à l'intervention de la structure temporelle (*) que la morphogénèse est contrôlée à la fois par la lumière et par l'auxine (les morphactines en sont antagonistes).

Deux arguments viennent à l'appui de cette conception. En premier lieu, les effets de la lumière bleue. Les longueurs d'ondes requises par *Acetabularia* pour réaliser sa morphogénèse sont précisément celles qui sont capables d'induire des déphasages du RC de la photosynthèse.

De la même manière, l'IAA agit à la fois sur la vitesse de formation du chapeau — de façon dépendante du moment où il est introduit dans le milieu de culture — et sur les RC de fonctions physiologiques.

En second lieu, l'évolution de la teneur en AMP cyclique. Bien que la fonction en soit inconnue dans les végétaux, il apparaît que, d'une manière ou d'une autre, l'AMP cyclique joue un rôle dans la morphogénèse de l'algue. En effet, la teneur en AMP cyclique oscille selon un RC (biphasique) pendant la période de grande croissance de l'algue, mais pendant cette période seulement (fig. 6a). Cette période de grande croissance est précisément celle pendant laquelle la teneur en AMP cyclique est basse, beaucoup plus basse que pendant la période qui la précède ou qui la suit (fig. 6.b). C'est également alors que les substances interférant avec le métabolisme de l'AMP cyclique exercent un effet sur le développement de l'algue (fig. 6c).

(*) La structure temporelle définit les relations de phase (et donc les niveaux relatifs) des différentes fonctions oscillantes au cours d'un cycle de 24 h.

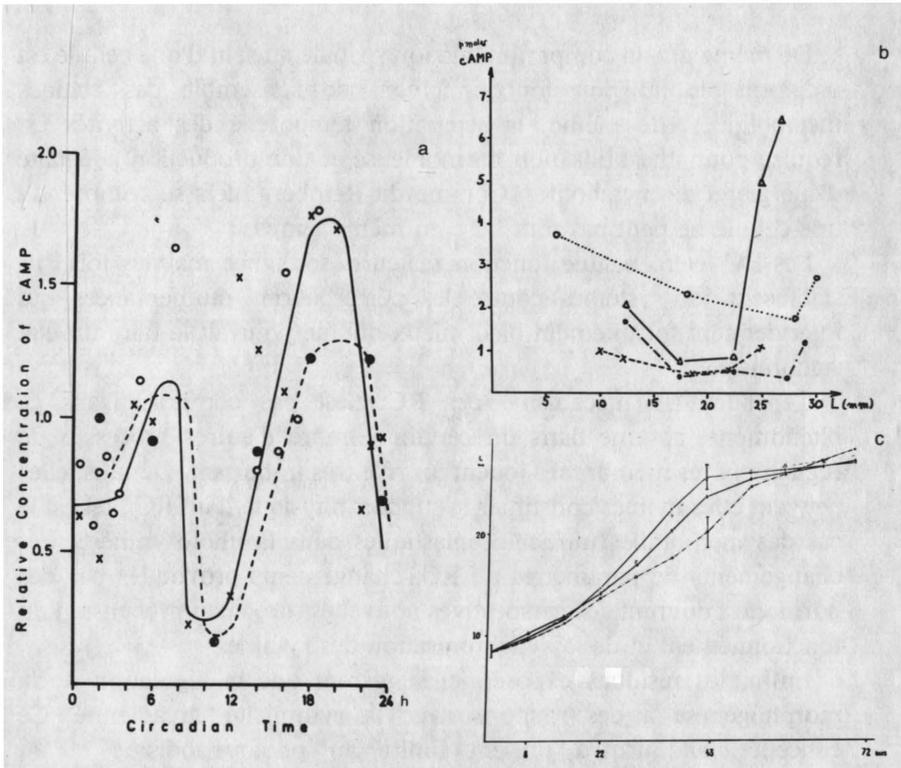


FIGURE 6a.— RC de teneur en AMP cyclique : la concentration (en pM par 100 mg de poids frais) est exprimée en valeur relative, c'est-à-dire par rapport aux valeurs moyennes des séries d'expériences. o, valeurs obtenues à Bruxelles sur *A. mediterranea* en LD. x, valeurs obtenues à Fayetteville sur *A. crenulata* en LD. Ces deux séries d'expériences permettent de tracer la courbe en trait continu. ⊗, valeurs obtenues à Fayetteville en lumière continue. Ces valeurs suggèrent la courbe en trait discontinu.

FIGURE 6b.— Teneur en AMP cyclique par 100 mg de poids frais d'*A. mediterranea* à différents stades de développement, exprimés par la longueur des algues en mm.

FIGURE 6c.— Croissance d'*A. mediterranea* au cours du temps : la taille en mm est exprimée en fonction du temps en jours. La croissance des témoins est représentée par la courbe en trait plein avec des x. C'est pendant la phase de grande croissance que la théophylline, inhibiteur de la phosphodiesterase, agit sur le développement de l'algue. Selon la concentration, l'effet est inhibiteur ($2 \cdot 10^{-3}$ M) ou stimulant (10^{-3} et 10^{-4} M). Des résultats comparables ont été obtenus avec la papavérine et avec un agent stimulant l'adénylate cyclase, l'isoprotérénol.

Les figures ont été reproduites avec permission de Chronopharmacology, Pergamon Press, 1979, et de Differentiation 5, 1976, 1976 and 10, 1978.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

De même que la compartimentation spatiale au sein d'une cellule est indispensable au bon fonctionnement de l'ensemble des chaînes métaboliques, de même, la séparation temporelle des activités est requise pour une utilisation harmonieuse et une production adéquate d'énergie et de métabolites. Comme dit Reinberg, cela se comprend : une cellule ne peut pas tout faire en même temps.

Les RC exercent une fonction majeure, soulignée maintes fois : ils stabilisent les systèmes contre les perturbations momentanées qui interviennent fortuitement bien mieux que ne pourrait le faire un état stationnaire.

Cependant le mécanisme des RC n'est pas compris. Dans ce phénomène, comme dans un certain nombre d'autres processus de régulation, les membranes jouent un rôle très important. De plus, elles peuvent elles-mêmes constituer le support physique d'un RC : tel est le cas des membranes intrachloroplastiques dans la photosynthèse. Les changements de paramètres de RC, changements provoqués par des hormones, ouvrent des perspectives nouvelles sur la compréhension du fonctionnement et de la synchronisation des rythmes.

Enfin, les résultats exposés ici suggèrent que la régulation de la morphogénèse a des rapports avec la rythmicité circadienne. Ce concept était jusqu'à présent limité au photopériodisme et au métabolisme acide des Crassulaceae, cas particulier du photopériodisme.

Le déroulement du programme morphogénétique pourrait de manière générale être lié au développement des activités rythmées de certains enzymes clefs, dont les relations de phase et les valeurs maximum et minimum seraient critiques. L'apparition éventuelle de tels enzymes oscillants ou l'évolution de leur activité rythmée pourraient être due à deux processus : a) l'apparition d'enzymes (ou de nouveaux isozymes) liée au déroulement du programme génétique de développement ; b) l'apparition d'enzymes (ou de nouveaux isozymes) photoinduits.

Nous nous proposons de porter nos efforts vers la recherche des enzymes qui pourraient apparaître au moment de la formation du chapeau, leur taux d'activité et leurs oscillations.

RÉFÉRENCES

- E. BÜNNING.— *Die Physiologische Uhr*. Springer 1980 (nouvelle édition) ou *The physiological Clock*. Springer 1967 (2^e édition).
- A. REINBERG et J. GHATA.— *Les rythmes biologiques*. Presses Universitaires de France, 3^e ed. 1978.
- A. REINBERG and F. HALBERG (éditeurs).— *Chronopharmacology*. Pergamon Press 1979.
- Th. VANDEN DRIESSCHE.— *Circadian rhythmicity: general properties – as exemplified mainly by Acetabularia – and hypotheses on its cellular mechanism*. *Arch. Biologie* 91, 49-76, 1980.
-

R. Kram, M. Guyaux, H. Schmitt, Y. Goldberg
et M. Rivière

Titre XII

Changements membranaires associés à la différenciation de cellules leucémiques en culture

«Veille aux pavés mais regarde les étoiles»
Goethe.

RÉSUMÉ

Des agents chimiques non physiologiques, désignés sous le vocable d'inducteurs chimiques de la différenciation, possèdent la propriété d'induire la différenciation terminale de lignées cancéreuses indifférenciées en cellules différenciées «normalisées» c.à.d. spécialisées et incapables de se diviser. L'analyse des changements membranaires précoces associés à la différenciation de cellules leucémiques murines en culture, a permis la mise en évidence d'un effet commun à plusieurs inducteurs chimiques de structure non apparentée : une augmentation précoce et transitoire des récepteurs membranaires pour les hormones β -adrénergiques.

Le modèle des cellules leucémiques de Friend (FLC) est le premier exemple, historiquement, d'une série de systèmes biologiques qui illustrent la normalisation «*in vitro*», c.à.d. en culture, de lignées cancéreuses non ou peu différenciées, en relation avec l'induction de la différenciation cellulaire. La liste de ces systèmes inclut, actuellement, des lignées cancéreuses d'espèces animales variées, y compris d'origine humaine, et appartenant à différents lignages cellulaires, par exemple d'origine embryonnaire, sanguine, musculaire et nerveuse.

Note indiquant les abréviations utilisées dans l'article :
FLC, Friend leukemic cells ; CFU, «colony-forming-units» ; DMSO, diméthylsulfoxyde ; HMBA, hexaméthylène-bisacétamide ; TPA ou PMA, tétradécanyl-phorbol-acétate ou phorbol-myristate-acétate.

Lors de la différenciation cellulaire normale, des cellules souches, proliférantes et indifférenciées, acquièrent des structures et des propriétés fonctionnelles spécialisées : parallèlement, elles perdent la capacité de se diviser et deviennent des cellules à durée de vie finie. L'homéostasie d'un lignage cellulaire dépend donc d'un équilibre entre les processus de division cellulaire des cellules souches et de mort des cellules différenciées de ce lignage. Cet équilibre est à la base du renouvellement harmonieux de nombreux tissus de l'organisme, comme les globules rouges et blancs du sang et les cellules de revêtement des épithélia de la peau, des voies bronchiques et digestives.

Toute défaillance de l'option de différenciation, qui intervient dans une filière de différenciation d'un lignage cellulaire avant la perte de l'option de division cellulaire, aboutit, par l'expansion exponentielle d'un compartiment de cellules non ou peu différenciées, à une prolifération cancéreuse entretenue de ce lignage.

Cette manière nouvelle de concevoir la transformation cancéreuse conduit donc à assimiler cette maladie à une altération du développement normal, caractérisée selon l'expression du pathologiste américain B. PIERCE par une « caricature de la différenciation des cellules souches » : cette interprétation repose, il convient de le souligner, sur de nombreuses données expérimentales recueillies sur des cancers humains « *in vivo* », originaires de différents lignages cellulaires (PIERCE, 1974).

Le défaut de différenciation peut résulter d'une lésion de la cellule souche par l'action d'un agent carcinogène physique, chimique ou viral mais n'implique pas nécessairement une lésion génétique de la cellule souche. Une cellule normale, placée dans un environnement anormal, peut acquérir un comportement cancéreux, comme l'illustre le développement de tératocarcinomes chez la souris par implantation de jeunes embryons de souris dans des localisations ectopiques. Ces tératocarcinomes (du grec « tératon » = monstre) sont des tumeurs qui contiennent, pêle-mêle et désorganisés, des ébauches de tissus différenciés provenant de la différenciation de cellules cancéreuses indifférenciées de carcinome embryonnaire. Replacées dans un jeune embryon, c.à.d. dans un environnement adéquat, lequel est ultérieurement implanté dans l'utérus d'une femelle, ces dernières se comportent comme des cellules embryonnaires normales, capables de participer à l'organogénèse des différents tissus et ne produisent aucun cancer (MINTZ et ILLMENSEE, 1975 et 1976).

Avant d'aborder la description du système des cellules leucémiques de Friend et d'exposer les résultats de notre contribution à leur étude, nous pouvons conclure cette introduction générale en passant en revue un certain nombre de conclusions fondamentales et d'applications médicales, qui se dégagent des travaux fondamentaux sur la différenciation induite *in vitro* de lignées cancéreuses indifférenciées :

1. La réversibilité du phénotype cancéreux associée à la différenciation de certaines lignées cancéreuses humaines et animales implique l'origine non-mutationnelle de certains cancers, même si la généralisation de cette conclusion n'est pas correcte.
2. L'analyse de cette différenciation permet de dresser un inventaire des changements cytologiques et biochimiques caractéristiques de la différenciation d'un lignage et de les organiser dans une séquence temporelle et, à plus long terme, causale. Un autre exemple de cette application fondamentale est illustré par l'outil fructueux que constituent les cellules de carcinome embryonnaire pour l'étude des stades précoces de l'embryogenèse des mammifères (MARTIN, 1980).
3. L'identification des cellules souches fait encore défaut pour de nombreux lignages cellulaires et lorsque celles-ci sont connues, il n'est pas possible de disposer de préparations homogènes de ces cellules pour les caractériser et étudier les étapes de leur filière de différenciation.
4. L'établissement en culture *in vitro* de lignées cancéreuses homogènes et l'étude de leur phénotype différencié induit *in vitro* ont permis des progrès tout récents dans la mise en évidence de nouveaux marqueurs caractéristiques des cellules souches de différents lignages cellulaires sanguins : ces données nouvelles bouleversent actuellement les classifications des leucémies humaines, avec des répercussions directes sur le diagnostic précis de leur lignage et vraisemblables sur le plan thérapeutique.
5. Des perspectives nouvelles s'offrent pour le traitement de certains cancers, par induction de la différenciation des cellules souches d'une manière spécifique, sans les inconvénients d'une chimiothérapie non sélective vis à vis des cellules cancéreuses par rapport aux tissus normaux en constant renouvellement ; si cette approche se révèle éventuellement efficace dans certains cas, son utilisation restera cependant limitée car de nombreux cancers ont, au cours de leur progression, subi des remaniements chromosomiques et sont devenus aneuploïdes, lorsque le diagnostic est posé.

Le système biologique des cellules leucémiques de FRIEND

La leucémie de Friend est une maladie de la souris caractérisée par une splénomégalie et une hépatomégalie, associées à l'infiltration de ces organes et du sang par des cellules hématopoïétiques immatures. Elle est causée par un complexe de deux virus oncogènes à RNA, responsables de la transformation cancéreuse d'un élément immature, précurseur de la lignée des globules rouges : probablement un proérythroblaste CFU_e (Colony Forming Unit répondant à l'érythropoïétine). Cette transformation se traduit par une perte de leur sensibilité à l'érythropoïétine, l'hormone qui induit la différenciation physiologique de la lignée érythroïde, d'où prolifération autonome exponentielle de ces proérythroblastes transformés.

En 1966, Charlotte FRIEND et collaborateurs réussissent à établir en culture continue *in vitro* des lignées de cellules de Friend (FLC) et en 1971, ils découvrent incidemment une propriété remarquable de ces cellules : celle d'être induites à se différencier *in vitro* en réponse à l'addition au milieu de culture de diméthylsulfoxyde (DMSO), un agent cryoprotecteur utilisé pour préserver la viabilité de cellules congelées : un culot, obtenu par centrifugation de cellules exposées au DMSO, présente une coloration rose à rouge et l'examen de ces cellules révèle une morphologie de normoblastes différenciés ainsi que la présence d'hémoglobine détectable par une coloration simple à la benzidine (FRIEND *et al.*, 1971).

Ce processus de différenciation terminale induite *in vitro* prend 5 à 6 jours et réalise une récapitulation fidèle de changements connus et caractéristiques de l'érythropoïèse physiologique, telle qu'elle se déroule normalement dans la moëlle osseuse (ou dans le foie pendant la vie foetale) :

- maturation morphologique caractérisée par une réduction de la taille des cellules et une condensation de leur noyau,
- arrêt de la croissance cellulaire,
- synthèse des RNA messagers de la globine et synthèse de globine,
- synthèse d'hème via l'induction des enzymes biosynthétiques correspondantes
- synthèse de protéines membranaires et d'enzymes, caractéristiques du globule rouge mûr.

De ce point de vue, le système de FLC s'est révélé très utile pour la description des paramètres biochimiques et l'analyse des mécanismes

moléculaires de la différenciation terminale de la lignée érythroïde car il est très difficile d'obtenir des populations importantes et homogènes des précurseurs normaux et de les maintenir en culture pour des périodes de quelques jours. En outre le système des FLC se prête à une analyse génétique de ces mécanismes.

L'étape-clé du processus de différenciation induite des FLC consiste en un événement intracellulaire appelé «engagement» (commitment), à l'issue duquel la cellule est irréversiblement vouée à exprimer son programme de différenciation, même en l'absence d'inducteur. La cinétique de ce phénomène de «commitment» peut être suivie en clonant dans un milieu semi-solide sans inducteur, les cellules d'une culture traitée par un agent inducteur pour des temps croissants. Dans ces conditions, on observe deux types de colonies : d'une part, des colonies de grande taille constituées exclusivement de cellules indifférenciées et d'autre part des petites colonies d'au maximum 32 cellules différenciées. Ces dernières représentent la descendance d'une cellule engagée au moment du clonage et leur taille implique que l'engagement résulte en une limitation finie de la capacité de prolifération.

Les inducteurs chimiques de la différenciation des FLC

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) a été le premier agent inducteur découvert accidentellement, en 1971, par C. Friend et collaborateurs : il est actif à une concentration de 1.5 à 2 % (200 mM), qui est proche des concentrations cytotoxiques. Cette propriété a été exploitée pour isoler des mutants résistants au DMSO, dont certains sont bloqués à différents stades de l'expression du programme de différenciation érythroïde.

Depuis, la liste des agents inducteurs s'est allongée, comprenant notamment :

- des composés polaires à structure plane comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) et la diméthylformamide (DMF),
- plusieurs diamines acétylées dont la plus active est l'hexaméthylène bisacétamide (HMBA)
- des acides gras à courte chaîne, tels que l'acide butyrique
- des dérivés de purines,
- l'ouabaine, un inhibiteur de l'ATPase (Na^+ / K^+) membranaire

Les mécanismes par lesquels ces différents composés induisent la différenciation terminale des FLC font l'objet de nombreuses recherches et sont loin d'être élucidés. En particulier, on ignore encore

si ces différents inducteurs agissent par un ou des mécanismes différents, et dans cette seconde hypothèse si ces derniers convergent vers une étape commune, nécessaire à l'engagement.

Les résultats des recherches dans ce domaine seront particulièrement intéressants car aussi bien certains inducteurs chimiques, comme le DMSO, l'HMBA, la DMF et l'acide butyrique, que des inhibiteurs, comme l'hydrocortisone et le TPA, de la différenciation induite *in vitro* des cellules de Friend, sont également actifs sur la différenciation d'autres types cellulaires. On relèvera, parmi d'autres exemples découverts récemment, ceux de deux lignées leucémiques humaines :

- l'une de leucémie promyélocytaire aigue, qui se différencie *in vitro* en globules blancs polynucléaires.
- l'autre, diagnostiquée initialement comme leucémie myéloïde aigue, mais qui subit, comme les FLC, une différenciation érythroïde.

Changements membranaires associés à la différenciation des FLC

Lorsque notre unité de recherches a entamé ses investigations sur le mécanisme d'action des inducteurs chimiques de la différenciation, un certain nombre d'informations suggéraient que des modifications membranaires précoces seraient impliquées dans la génération du processus moléculaire responsable de l'engagement. En effet, la membrane est le site d'action démontré ou supposé des agents suivants :

- 1) l'ouabaine, un inhibiteur de l'ATPase Na^+/K^+ de la membrane plasmique, induit de la différenciation des FLC.
- 2) les anesthésiques locaux, du type procaïne et dibucaïne, inhibent la différenciation induite par le DMSO et exercent sur les propriétés physiques de membranes artificielles des effets opposés à ceux du DMSO et d'autres agents cryprotecteurs.
- 3) le TPA (12-0-tétradécanoylphorbol 13-acétate), un promoteur de la carcinogenèse chimique, dont les effets sur les membranes plasmiques sont bien documentés, inhibe la différenciation érythroïde induite des FLC.

Nous avons donc décidé de concentrer nos efforts sur l'analyse de changements membranaires associés à la différenciation des cellules de Friend. Un objectif implicite de ces investigations visait à la mise en évidence de changements précoces préalables à l'engagement et susceptibles de nous éclairer sur la nature des changements primaires causés par les agents inducteurs : en effet les paramètres biochimiques

de la différenciation des FLC recensés jusqu'alors reflétaient des marqueurs tardifs, postérieurs à l'étape d'engagement.

Notre analyse des changements membranaires a débuté par la caractérisation et l'analyse des modifications des propriétés d'une enzyme membranaire complexe, l'adénylate cyclase. Trois agents inducteurs de structure chimique différente (DMO, HMBA et acide butyrique) ont été utilisés afin d'apprécier la signification des changements observés. L'activation de cette enzyme, qui catalyse la conversion d'ATP en AMP, 3' : 5' cyclique ou cAMP, représente en effet la première étape du mécanisme d'action de nombreuses hormones, de structure variée, qui contrôlent des processus métaboliques et/ou la prolifération cellulaire dans leurs tissus-cibles respectifs. Cet AMP cyclique joue le rôle de messenger secondaire : il exerce les effets intracellulaires qui conduisent à la réponse physiologique caractéristique de chaque hormone. C'est le couplage de l'adénylate cyclase à des récepteurs membranaires spécifiques pour chaque hormone qui explique, malgré la similitude du mécanisme de relais transmembranaire du premier messenger (l'hormone), la spécificité des effets du cAMP pour une hormone et un tissu particuliers.

La différenciation des FLC s'accompagne d'une augmentation de la réponse de l'adénylate cyclase aux catécholamines (notamment l'adrénaline agissant via des récepteurs adrénergiques β_2) et à la prostaglandine E_1 , alors que la stimulation de cette enzyme par un effecteur non hormonal tel que les ions fluorure demeure inchangée. Des changements interviennent parallèlement dans le couplage β récepteurs-cyclase. Ces modifications traduisent une évolution, au cours de la différenciation des proérythroblastes leucémiques en normoblastes, des propriétés de ce système membranaire complexe vers un phénotype caractéristique de celui de l'érythrocyte mûr.

Les récepteurs β adrénergiques des cellules de Friend ont ensuite été caractérisés en tant que second marqueur membranaire et en vue de mieux comprendre le mécanisme de l'amplification de la stimulation de l'adénylate cyclase par les catécholamines observée au cours de la différenciation terminale des proérythroblastes leucémiques. Les récepteurs β adrénergiques ont été identifiés par la liaison d'un ligand radioactif, l'hydroxybenzylpindolol (HYP), un antagoniste β marqué à l' I^{125} ; la liaison du ligand I^{125} -HYP est stéréospécifique et saturable ; elle correspond, après analyse par la méthode de Scatchard, à une classe unique de récepteurs non coopératifs présentant une constante de

dissociation K_d de 5×10^{-11} M. Le nombre des récepteurs est d'environ 1500/cellule, tant pour les proérythroblastes leucémiques de départ que pour les normoblastes différenciés. Cependant, la densité des récepteurs augmente d'un facteur 4, compte tenu de la réduction de la taille cellulaire au cours de la différenciation.

Trois agents inducteurs (le diméthylsulfoxyde, l'hexaméthylène bisacétamide et l'acide butyrique) de la différenciation *in vitro* des FLC induisent une augmentation précoce (décelable dès 5 h et maximale après 16 h) et transitoire du nombre des récepteurs. Cette augmentation, qui est inhibée en présence de cycloheximide, reflète vraisemblablement une synthèse «de novo» de récepteurs.

Nous avons enfin détecté, au cours de la différenciation érythroïde des FLC, des changements dans le couplage entre les récepteurs β adrénergiques et de l'adénylate cyclase : ce couplage, qui est peu efficace et peu sensible aux nucléotides guanyliques dans les cellules leucémiques de départ et après 24 h. d'induction, devient très marqué dans les cellules différenciées terminales après 5 jours de traitement par les agents inducteurs.

Relation entre l'induction des récepteurs β adrénergiques et la différenciation érythroïde des FLC

L'observation que trois inducteurs, de structure chimique différente, causent une augmentation précoce et transitoire du nombre des récepteurs suggérait la mise en évidence d'un marqueur biochimique particulièrement précoce du programme de différenciation érythroïde des FLC. La signification physiologique de cette observation pouvait être interprétée sur la base d'observations du groupe d'ADAMSON : le nombre des colonies érythropoïétiques (CFU) obtenues *in vitro* à partir de moëlle osseuse humaine en présence d'érythropoïétine (à laquelle les FLC ont perdu la capacité de réagir) est accru en présence d'effecteurs β -adrénergiques (BROWN et ADAMSON, 1977).

Nous nous sommes donc efforcés de préciser le rôle possible de ce changement membranaire précoce sur des étapes postérieures de la différenciation érythroïde. Dans une première étape, une réponse négative provisoire a été obtenue sur la base d'arguments indirects : la dexaméthazone et la phorbol-myristate-acétate (PMA), qui inhibent l'accumulation d'hémoglobine au cours de la différenciation des FLC, n'empêchent pas l'augmentation précoce des récepteurs β -adrénergiques. Cette observation était équivoque, car l'effet inhibiteur sur la

différenciation des glucocorticoïdes et du PMA, agent promoteur de la carcinogenèse chimique, pouvait s'exercer à une étape postérieure à l'induction des récepteurs β .

Nous avons réussi à donner une réponse définitive à cette question grâce à l'utilisation d'agents pharmacologiques mis à notre disposition pour explorer le rôle possible des ions Ca^{++} dans le mécanisme d'action des inducteurs chimiques de la différenciation : la cinnarizine et son dérivé fluoré, la flunarizine inhibent l'induction des récepteurs sans empêcher la différenciation érythroïde des FLC. Cet effet est spécifique sur les récepteurs β : en effet, la cinnarizine et la flunarizine inhibent l'activation de l'adénylate-cyclase par les catécholamines mais ne modifient pas l'activation de cette enzyme membranaire par la prostaglandine E_1 .

Ce résultat étonnant n'exclut cependant un rôle pour les récepteurs β dans le contrôle de l'érythropoïèse normale : elle pourrait s'expliquer par leur intervention dans la différenciation physiologique induite par l'érythropoïétine et ne pas s'exprimer dans la différenciation des cellules leucémiques de Friend, insensibles à l'action de l'érythropoïétine.

Alternativement, les changements membranaires mis en évidence par nos études sur les cellules de Friend pourraient traduire un effet des inducteurs chimiques, indépendant du lignage cellulaire. Cette interprétation, tout aussi intéressante, est suggérée par le fait que différents agents inducteurs provoquent une augmentation de la stimulation adrénergique de l'adénylate cyclase dans d'autres types cellulaires, notamment des hépatocytes fœtaux de rat et des cellules cancéreuses humaines Hela. Dans celles-ci comme dans les FLC, l'acide butyrique est, de ce point de vue, l'inducteur le plus efficace, qui induit l'augmentation maximale du nombre des récepteurs β adrénergiques.

BIBLIOGRAPHIE

«La normalisation des cellules cancéreuses», dans *La Recherche*. Vol. 10, pp. 1271-1272 (n° 106, décembre 1979).

«*Sciences de la vie et société*», F. GROS, F. JACOB et P. ROYER. La documentation française, Paris 1979 et Editions du Seuil.

Titre XIII

La génétique de la détermination

«Mettre en doute ses connaissances est sage,
mettre en doute son ignorance est fou».

Lao-Tzeu

(Tao te king, -570 ? – -490 ?)

RÉSUMÉ

Comment les gènes contrôlent-ils le développement d'un organisme, depuis l'œuf fécondé jusqu'à l'état adulte ? Des travaux récents sur la drosophile ont montré que l'embryon est divisé en compartiments, dont chacun est défini par l'activité de certains gènes de contrôle. La complexité énorme de l'adulte provient donc de la répétition, avec des variantes, d'un motif de base beaucoup plus simple.

1. INTRODUCTION

La biologie moléculaire d'organismes aussi simples que les bactéries et leurs virus a permis de mettre en évidence certains principes de base de la vie : identification de l'ADN comme matériel héréditaire ; découverte de sa structure, qui explique comment ce matériel est fidèlement répliqué ; décryptage du code génétique, qui permet de fabriquer des protéines sur base des instructions contenues dans l'ADN ; mode de repliement des protéines, qui confère à chacune une activité bien précise ; mise en évidence de gènes régulateurs, dont la fonction est de contrôler l'expression (l'activité) d'autres gènes. Si la généralité de ces principes ne fait aucun doute en ce qui concerne la structure de l'ADN, le code génétique et la structure des protéines, par contre nous sommes dans la plus complète ignorance en ce qui concerne les mécanismes de régulation chez les organismes supérieurs. Certes, nous avons appris énormément de choses sur les régulations bactériennes (voir Titre IV). On sait que les différents gènes d'une bactérie ne sont pas exprimés en permanence : un bon nombre d'entre

eux sont régulés, en ce sens que leur activité est assujettie à la composition du milieu environnant. Ainsi, les gènes responsables de l'assimilation d'un certain sucre s'expriment lorsque ce sucre est présent dans le milieu, et restent silencieux en son absence. Inversement, l'activité des gènes nécessaires à la synthèse de certains produits essentiels est éteinte dès que ceux-ci apparaissent dans le milieu. La bactérie a donc développé un réseau de mécanismes de contrôle tel qu'elle n'élabore certaines enzymes que lorsque le milieu extérieur l'exige.

On voit tout de suite que le problème de la régulation se pose en termes entièrement différents dans le cas d'animaux pluricellulaires. En effet, la plupart d'entre eux disposent de mécanismes qui maintiennent à peu près constante la composition du milieu extracellulaire : il n'est plus besoin, dès lors, d'ajuster constamment les quantités de telle ou telle enzyme présente dans les cellules. Par contre, les pluricellulaires dérivent tous d'une cellule initiale, l'œuf fécondé, dont la descendance se diversifie progressivement pour donner finalement tous les types cellulaires présents dans l'adulte. Le rôle majeur des régulations est donc tout à fait différent chez les bactéries et chez les pluricellulaires : dans le premier cas, il faut ajuster l'activité des gènes à la composition d'un milieu ambiant sans cesse variable ; dans le deuxième cas, il faut contrôler l'activité de chaque gène en fonction d'un programme de développement de manière que chaque gène s'exprime au «bon» moment et dans les «bonnes» cellules.

On peut en fait distinguer trois composantes dans le processus complexe qui mène de l'œuf fécondé à l'organisme adulte. D'abord, la «détermination» : par quel mécanisme des cellules qui contiennent le même matériel génétique choisissent-elles de devenir cellules de muscle ou cellules d'épiderme, cellules de bras ou cellules de jambe ? Puis, la «différenciation» : comment une détermination donnée entraîne-t-elle l'expression coordonnée d'une batterie de gènes telle que la cellule acquière des propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques bien particulières ? Enfin, le maintien de l'état différencié : comment une cellule, une fois différenciée, reste-t-elle bloquée à ce stade et continue-t-elle à exprimer sélectivement la même batterie de gènes pendant toute son existence ?

Cette distinction est sans doute un peu arbitraire dans la mesure où, pour la plupart des organismes, on ne dispose pas de moyens permettant de séparer détermination et différenciation. Chez la

drosophile, par contre, ces deux processus sont clairement séparés dans le temps, comme nous allons le voir dans la section suivante.

2. LE DÉVELOPPEMENT DE LA DROSOPHILE

Comme les autres insectes à métamorphose complète, la drosophile subit une transformation radicale, d'une larve vermiforme et totalement dépourvue d'appendices (ailes, pattes, antennes ...) à une mouche adulte dont chacun connaît l'apparence externe. Comment s'opère cette transformation ? En fait, il n'y a pas à proprement parler de transformation, mais plutôt substitution d'un animal par un autre : en effet, pendant la métamorphose, toutes les cellules composant les tissus larvaires meurent, et sont remplacées par les cellules propres à l'adulte. Ces dernières, appelées imaginales (l'imago étant le nom donné à la forme adulte d'un insecte) étaient déjà présentes dans la larve, et sous l'influence d'une hormone de métamorphose se différencient pour produire les tissus et les structures propres à l'adulte. On peut donc considérer que la drosophile est constituée de deux individus : la larve et l'adulte, avec chacun ses cellules et ses tissus propres. La seule exception à cette dualité est le système nerveux central qui, lui, est en gros commun à la larve et à l'adulte, et subit seulement quelques transformations pendant la métamorphose sans qu'il y ait destruction massive des cellules larvaires.

Ces deux individus, larve et adulte, coexistent pendant toute la phase larvaire. Mais alors que les cellules propres à la larve sont différenciées en ont donc des aspects et des propriétés bien particuliers (cellules d'épiderme, de muscle, de tube digestif, de trachées ...), les cellules imaginales au contraire sont indifférenciées et ont donc pour principale caractéristique de n'en point avoir : rien ne permet de distinguer une cellule imaginale qui deviendra, à la métamorphose, musculaire d'une autre qui deviendra digestive.

Prenons le cas des cellules qui formeront l'épiderme de l'adulte. Ces cellules restent indifférenciées et prolifèrent pendant toute la vie larvaire de telle manière que pour chaque cellule imaginale présente à l'éclosion de la larve, on en retrouve en moyenne mille au moment de la métamorphose. A ce moment, ces cellules s'étirent, s'aplatissent, ou se contractent de telle manière que l'ensemble adopte progressivement la forme finale que l'on observe dans l'adulte ; certaines deviennent épiderme, secrètent la cuticule et se pigmentent ; d'autres deviennent

neurones et émettent un axone qui s'en va rejoindre le système nerveux central ; d'autres encore produisent les soies et leurs soquets, et les autres structures sensorielles. Ces cellules imaginaires sont réparties dans la larve en petites masses translucides, plus ou moins arrondies, d'où leur nom de «disques imaginaires». Les disques imaginaires sont situés en des endroits bien définis du corps de la larve, si bien qu'on les reconnaît aisément les uns des autres. Différentes expériences d'extirpation et de greffe ont démontré que chacun de ces disques produit une partie bien précise de l'adulte : tel disque situé à tel endroit de la larve formera inmanquablement une première patte (les disques viennent presque tous par paires), tel autre deviendra un œil et une demi-tête, tel autre encore produira une aile et une demi-boîte thoracique. On peut prélever un de ces disques, et le faire métamorphoser *in vitro* : il formera la même structure adulte que s'il était resté en place, dans la larve. Mieux encore : si l'on coupe un disque en fragments que l'on fait métamorphoser séparément, chacun produira un fragment de cette même structure adulte. C'est ce qui a amené à dire que les cellules des disques imaginaires sont «déterminées» : alors même qu'elles paraissent toutes identiques, chacune «sait» déjà en quelle structure elle va se différencier lors de la métamorphose. On a pu établir que cette détermination se produit très tôt, pendant la formation de l'embryon. L'état déterminé est maintenu pendant toute la phase de prolifération qui accompagne la croissance larvaire, de telle manière qu'au moment de la métamorphose chacun des mille descendants a conservé l'état de détermination de son lointain ancêtre. On se trouve donc en présence d'un phénomène de choix initial – choix d'une voie de développement – qui est maintenu au travers de nombreuses divisions cellulaires pour s'exprimer bien plus tard, au moment de la différenciation.

Cette situation est particulièrement séduisante pour des généticiens : en effet, tout se passe comme si cette détermination représentait un cas de régulation génétique pur, non compliqué par l'apparition quasi-simultanée de tous les changements concomitants à la différenciation. De plus, aussi simple soit-il, ce système présente les deux aspects essentiels des régulations chez les pluricellulaires : d'une part, la décision de cellules initialement identiques d'opter pour des programmes de développement différents et, d'autre part, le maintien de cette décision au travers des divisions cellulaires, jusqu'au moment où la différenciation viendra mettre en œuvre ces divers programmes de développement.

La drosophile présente, de surcroît, des avantages particuliers pour l'étude de ce processus. En effet, chacun sait la place de cet organisme dans les travaux du groupe de Morgan, au début du siècle, travaux qui établirent la base chromosomique de l'hérédité. Depuis, la drosophile est restée l'objet de recherches intensives, ce qui a entraîné à la fois le développement de techniques nouvelles (comme l'analyse clonale, dont nous parlerons dans la section suivante) et la possibilité d'aborder génétiquement certains aspects essentiels du développement. Le résultat le plus remarquable de ces recherches est sans doute la formulation, ces dernières années, d'une théorie cohérente de la détermination, théorie que nous allons esquisser dans ce chapitre. Avant d'en arriver là, il nous faut expliquer deux notions génétiques importantes : la relation dominance – récessivité, et l'analyse colonale. Le lecteur peut prendre le risque de passer la section suivante qui traite de ces notions, si elle lui paraît trop rébarbative ; il nous semble cependant que cette section lui donnera une idée du type de démarche qu'utilisent les généticiens, et lui facilitera grandement la compréhension du modèle que nous exposons ensuite.

3. LA GÉNÉTIQUE DE LA DROSOPHILE

a) *Dominance et récessivité*

La drosophile possède à peu près cinq mille gènes répartis en quatre chromosomes différents. Chaque chromosome (et donc chaque gène) est présent en deux exemplaires dans toutes les cellules des femelles, à la seule exception des cellules reproductrices. Chez les mâles, la situation est légèrement différente, mais nous ne nous en préoccupons pas ici. Les drosophiles que l'on peut capturer dans la nature sont toutes virtuellement identiques : elles représentent ce qu'on appelle le type sauvage. En laboratoire, on peut isoler et conserver des variants qui diffèrent du type sauvage par tel ou tel trait, par exemple une extrême réduction de la taille des ailes. L'analyse montre, dans la plupart des cas, que ces variants sont des individus où les deux exemplaires d'un des cinq mille gènes portent une mutation. De tels individus sont dits *homozygotes* pour la mutation, qu'on appellera dans notre exemple *vestigial* (symbolisé par *vg*) pour rappeler le trait anormal. Le gène non muté sera représenté : *vg*^{*}. Que se passe-t-il alors dans un individu, dit *hétérozygote*, où les deux exemplaires du gène considéré sont différents, l'un portant une mutation et l'autre étant

normal ? Deux cas peuvent se présenter : ou bien l'individu hétérozygote présentera un aspect normal, et la mutation est alors dite *récessive*, ou bien l'hétérozygote sera anormal, et la mutation est dite *dominante*. La mutation *vg* relève du premier groupe, la mutation *Me* (moiré, qui donne aux yeux des reflets chatoyants) relève du second. Selon qu'une mutation s'avère récessive ou dominante, on lui attribue un nom qui commence par une minuscule ou une majuscule.

L'intérêt de cette classification est qu'elle nous renseigne déjà sur le type de perturbation que la mutation entraîne. En général, les mutations récessives sont dues à l'inactivation totale ou partielle d'un gène : dans un individu homozygote, les deux exemplaires du gène sont inactivés, la fonction normale du gène ne sera pas remplie et le caractère muté apparaîtra ; par contre dans l'hétérozygote, l'activité du gène normal suffit généralement pour que la fonction soit remplie, et le caractère muté n'est plus observable. Les mutations dominantes, au contraire, sont plutôt liées à une activité excessive ou anarchique du gène muté : dans ce cas, la présence d'un gène normal ne changera rien aux dérèglements du gène muté, et l'hétérozygote montrera un aspect anormal. Mentionnons enfin un cas très rare, mais dont nous rencontrerons plusieurs exemples dans ce chapitre : celui des mutations *dominantes par haplo-insuffisance*. Ces mutations correspondent à l'inactivation d'un gène, tout comme les récessives, et sont néanmoins observables dans un hétérozygote. Cela est dû au fait que, pour certains gènes, l'activité d'un seul des deux exemplaires normalement présents est insuffisante à assurer pleinement la fonction correspondante. Un individu hétérozygote pour une mutation dans un tel gène montrera donc un aspect anormal. La distinction entre les deux types de mutations dominantes est simple : il suffit d'ajouter un exemplaire supplémentaire du gène en question. Dans le cas d'une mutation dominante simple, le trait mutant subsistera ; dans le cas d'une dominance par haplo-insuffisance, l'aspect devient normal puisque les cellules contiendront deux exemplaires du gène normal en plus de l'exemplaire muté.

b) *L'analyse clonale : pourquoi ?*

La transformation d'un œuf fécondé en une structure aussi compliquée qu'un animal adulte est marquée par une série d'étapes majeures. Ces étapes essentielles qui se succèdent selon une séquence bien établie se retrouvent dans le développement embryonnaire

d'animaux apparemment très dissemblables : les similitudes entre le développement embryonnaire d'un requin et d'un homme sont, en bien des points, plus frappantes que leurs différences. C'est dire si les mécanismes qui président à ces changements successifs sont fondamentaux et pourtant, ils nous restent complètement mystérieux. Certes, l'approche descriptive et expérimentale a permis de mieux définir ces grandes étapes et leur enchaînement, mais on n'est encore nulle part dans la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents. Ceci n'est pas étonnant si l'on tient compte de ce que tout le jeu d'interactions moléculaires responsables de ces différentes étapes a pour cadre naturel la cellule et a pour effet final de décider du comportement de cette cellule. On voit alors que, avant même de pouvoir aborder le problème des mécanismes moléculaires, il faut comprendre le développement en termes cellulaires. Quel est le destin d'une cellule donnée et de sa descendance au cours des différentes étapes du développement ? Chaque cellule est-elle individuellement déterminée ? A quelle étape se produit cette détermination ? Dans quelle mesure l'état de détermination affecte-t-il le comportement cellulaire ? On voit bien que tant qu'on n'a pas de réponses à ces questions, il est futile de s'interroger plus avant sur les bases moléculaires de la détermination. Or, l'essentiel des travaux menés jusqu'à présent portent sur l'embryon pris dans son ensemble, ou, au mieux, sur les interactions entre différents tissus embryonnaires. La raison en est simple : s'il est relativement aisé d'observer le développement embryonnaire normal, ou même de procéder à quelques opérations chirurgicales simples, il est impossible – sauf dans de très rares cas – de supprimer, de greffer ou de marquer une seule cellule, et d'étudier les effets de telles opérations.

Chez la drosophile, de telles opérations sont tout aussi impraticables que chez n'importe quel organisme. Par contre, on y dispose d'une technique, la recombinaison mitotique, qui permet de procéder à ces opérations, non pas chirurgicalement mais génétiquement. En bref, cette technique consiste à traiter aux rayons X des larves d'individus hétérozygotes pour une mutation récessive. Ce traitement entraîne occasionnellement une recombinaison entre chromosomes homologues, telle qu'une des deux cellules-filles devient homozygote pour la mutation en question. Cette cellule continuera à se diviser exactement comme les cellules avoisinantes, et va donc produire un clone de cellules toutes homozygotes pour cette même mutation. Au moment de la métamorphose, ces cellules vont se différencier et on verra alors dans

un individu de type sauvage une plage de cellules qui, toutes, expriment le trait mutant (par exemple, une absence de pigmentation). La possibilité d'induire, à n'importe quelle étape du développement, des clones homozygotes pour une mutation donnée, a permis le déploiement d'une nouvelle méthode d'analyse du développement : l'analyse clonale, ainsi nommée parcequ'elle se base sur l'étude de clones (un clone est l'ensemble de la descendance d'une cellule donnée). Cette méthode, judicieusement exploitée par une poignée de chercheurs à l'esprit rigoureux et à l'œil observateur, a amené une contribution telle qu'il nous est indispensable d'en résumer les grandes lignes.

c) *L'analyse clonale : interprétation*

Dans cette section, nous allons indiquer les principaux types de renseignements que peut fournir l'analyse clonale. Tout d'abord, cette analyse nous permet d'estimer le mode de croissance d'un tissu donné tout au long du développement, ce qu'on appelle également les paramètres de croissance. Ceci se base sur le fait que la probabilité d'induire un clone homozygote dépend du nombre de cellules présentes et donc, la fréquence de clones observés dans l'adulte est une mesure du nombre de cellules présentes au moment de l'irradiation. La taille des clones, d'autre part, permet d'estimer le nombre de cellules, au moment de l'irradiation, qui à la métamorphose formeront une partie donnée de l'adulte. En effet, si un clone contient un centième des cellules de l'aile, on en déduit qu'au moment de l'irradiation il y avait une centaine de cellules destinées à former l'aile. Par exemple, un clone alaire induit pendant l'embryogenèse contient en moyenne un millier de cellules, alors qu'une aile adulte en contient à peu près vingt mille : cela indique que, dans l'embryon, il y a une vingtaine de cellules qui seront à l'origine des vingt mille cellules de l'aile adulte.

Le deuxième aspect de cette analyse, et il est essentiel pour notre propos, est la définition de lignes de restriction. Par exemple, lorsqu'on irradie un embryon, on pourra occasionnellement observer dans l'adulte un clone s'étendant à la fois sur l'aile et sur la deuxième patte. Par contre, si l'on irradie des larves à peine écloses, les clones seront toujours confinés soit à l'aile soit à la deuxième patte. Il y a donc eu, pendant les quelques heures séparant ces deux irradiations, apparition d'une ligne de restriction infranchissable par les clones, ligne qui sépare le deuxième segment thoracique en deux «compartiments» : l'un dorsal (aile et demi-boîte thoracique) et l'autre ventral (deuxième patte). Il faut

remarquer que les limites entre compartiments ne coïncident pas forcément avec des discontinuités morphologiques de l'adulte. Par exemple, avant même la ligne de restriction aile-patte, apparaît une ligne de restriction qui sépare chaque segment en un compartiment antérieur et un compartiment postérieur. Cette ligne divise en deux l'aile et la patte mais ne correspond à rien de visible : elle est seulement définie par le fait qu'un clone s'y arrêtera toujours, aussi grand soit-il. Ainsi, un clone induit très tôt pourra longer cette ligne sur une longueur correspondant à des centaines de cellules, tant dans l'aile que dans la patte, sans jamais la franchir, alors même que rien ne nous permet de distinguer les cellules situées de part et d'autre de cette limite (Fig. 1). Inversément, des démarcations aussi claires que la séparation entre articles des pattes ne correspondent pas à des limites de compartiments : un clone, même induit tardivement, pourra s'étendre sur deux articles consécutifs.

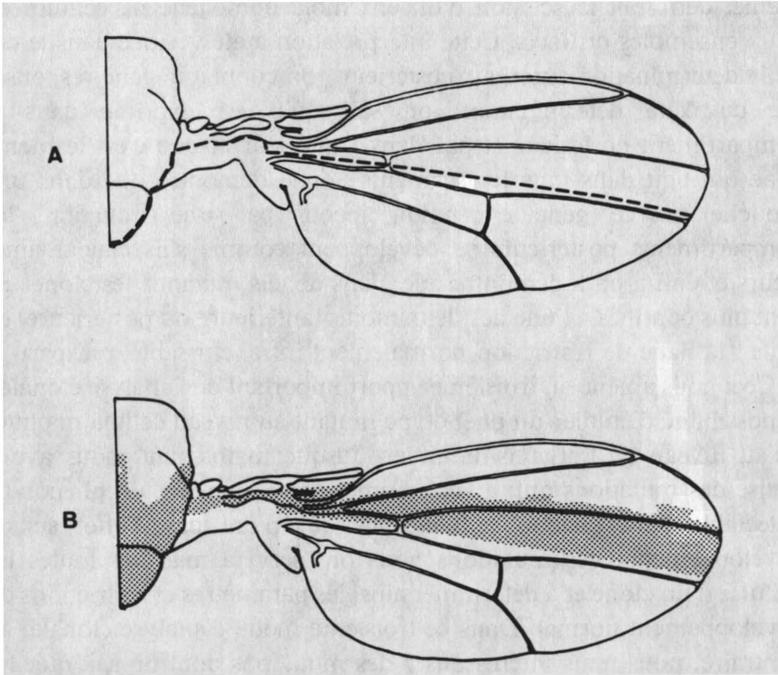


FIGURE 1.- Ligne de restriction séparant le mésothorax en un compartiment antérieur et un compartiment postérieur. En A, on a représenté en tirets la limite entre ces deux compartiments ; en B, on voit qu'un clone (pointillés) même très grand, ne franchit pas cette limite.

Nous en arrivons ainsi à la conclusion que le processus de détermination se fait par étapes, chacune consistant en un choix entre deux états possibles : antérieur ou postérieur, aile ou patte ... Juste après la blastula, la décision antérieur-postérieur est déjà prise, mais pas encore la décision aile-patte, comme le montre le fait que la descendance d'une cellule marquée à ce stade sera confinée au compartiment antérieur ou postérieur d'un segment, mais pourra contenir à la fois des cellules d'aile et des cellules de patte. On peut donc dire que les cellules, à ce stade précoce, sont déjà déterminées comme antérieures ou postérieures, mais pas encore comme aile ou patte. Peu avant l'éclosion de la larve, ce deuxième choix est fait à son tour et dès lors la descendance d'une cellule marquée à ce stade sera entièrement confinée soit à l'aile, soit à la patte. L'interprétation la plus simple de ces observations est qu'à chaque étape correspond un gène particulier, qui serait exprimé dans un compartiment et pas dans l'autre et, par là même, définirait la scission d'un ensemble homogène de cellules en deux ensembles distincts. Cette interprétation a été vérifiée dans le cas de la détermination antérieur-postérieur : on connaît le gène responsable de cette détermination, on sait qu'il est exprimé dans le compartiment postérieur et pas dans l'antérieur et que c'est le même gène qui agit dans tous les segments ; on a démontré que dans une mouche où ce gène est rendu inactif par une mutation, les compartiments postérieurs se développent comme s'ils étaient antérieurs et enfin, on a démontré que, dans de tels mutants, les clones ne sont plus confinés à l'une des deux moitiés (antérieure ou postérieure) de l'aile : la ligne de restriction normalement infranchissable a disparu.

Ceci nous amène au troisième apport important de l'analyse clonale : la possibilité d'étudier un phénotype mutant au niveau cellulaire plutôt qu'au niveau de l'organisme entier. Jusque maintenant, nous avons utilisé des mutations qui, à l'état homozygote, donnent un phénotype détectable dans chaque cellule mais qui n'ont pas d'effet sur le développement : ces mutations nous ont servi à marquer toutes les cellules d'un clone et à déterminer ainsi les paramètres et restrictions du développement normal. Dans ce troisième mode d'analyse clonale, au contraire, nous nous intéressons à des mutations dont on sait qu'elles altèrent le développement. De telles mutations peuvent, bien sûr, agir de bien des manières : elles peuvent avoir un effet tout à fait indirect, tel que l'altération visible du développement n'est qu'une lointaine conséquence de l'altération directement produite par la mutation ; elles

peuvent avoir un effet général dont l'altération du développement est seulement un des aspects ; ou, au contraire, elles peuvent toucher un gène directement responsable d'une des étapes du développement. Dans ce dernier cas, elles pourraient encore interférer soit avec la répartition spatiale de facteurs déterminant le choix des cellules aux différentes étapes du développement, soit avec les mécanismes génétiques responsables de ces choix eux-mêmes. Une observation, aussi minutieuse soit-elle, d'individus entièrement mutants ne permettra jamais de distinguer entre ces multiples explications. Pire encore, on peut imaginer que des mutations affectant certaines étapes du développement soient tout simplement létales si elles sont exprimées dans l'ensemble de l'individu : impossible alors de deviner l'effet qu'auraient eu de telles mutations sur le développement, si celui-ci n'avait pas été interrompu par la mort de l'individu ! On voit aisément que l'analyse clonale, c'est-à-dire l'analyse de clones de cellules mutantes dans des individus phénotypiquement normaux, permet d'étudier ces mutations au niveau cellulaire ; on s'attend alors à obtenir des résultats très différents pour chacune des explications énumérées ci-dessus.

4. LA SEGMENTATION ET LE LOCUS BITHORAX

a) *Les gènes du locus*

La segmentation est une étape tout à fait générale du développement embryonnaire, on la retrouve tant chez les vertébrés que chez les arthropodes. Certes, elle laisse des traces plus ostensibles chez ces derniers : chacun sait qu'un homard ou un mille-pattes sont segmentés, tandis que chez les vertébrés, ces traces sont moins visibles, la plus claire étant l'organisation de la colonne vertébrale. Aux stades précoces de l'embryogenèse, cependant, le boudin segmenté qui deviendra un homme ressemble étrangement à cet autre qui deviendra sauterelle. On est naturellement tenté d'accorder un rôle essentiel à une étape aussi universelle, et c'est là ce qui donne toute leur résonance aux résultats récents obtenus chez la drosophile : pour la première fois, nous entrevoyons dans un organisme le sens profond de la segmentation.

Il n'est évidemment pas possible, en quelques pages, de présenter l'ensemble d'arguments qui ont permis la construction progressive d'une théorie de la segmentation. Il serait dommage, d'autre part, de la

présenter de but en blanc. Nous avons donc opté pour un compromis, qui suggère la démarche et le raisonnement, sans entrer dans le vif des expériences. Ce faisant, nous avons dû ignorer les observations les plus ingénieuses et les raisonnements les plus pénétrants, qui sont malheureusement les plus ardues à expliquer ; tant il est vrai qu'en biologie, si les réponses importantes sont toujours simples, les détours pour y parvenir sont bien souvent complexes.

Dès que Morgan eut découvert la toute première mutation connue chez la drosophile, une recherche intensive de nouvelles mutations débuta, qui se poursuit d'ailleurs à l'heure actuelle. Certaines des milliers de mutations ainsi isolées ont un effet extrêmement curieux : elles transforment un segment, ou une partie de segment, en un autre. L'effet visible de ces mutations, appelées *homéotiques*, suggère qu'elles interfèrent d'une manière ou d'une autre avec le mécanisme assurant la détermination des segments. On pouvait dès lors espérer que les gènes affectés par ces mutations soient directement impliqués dans ces mécanismes de détermination, et que leur étude permette d'élucider le système de régulation responsable de cette étape essentielle du développement.

Une des premières mutations homéotiques qui ait été isolée fut appelée *bithorax* (*bx*). Le phénotype d'un individu homozygote pour cette mutation est assez remarquable : il possède deux boîtes thoraciques consécutives, et l'haltère est partiellement transformée en aile. Rappelons ici que les insectes possèdent trois segments thoraciques, porteurs chacun d'une paire de pattes. Chez la drosophile, le deuxième segment forme de surcroît l'essentiel de la boîte thoracique ainsi que les ailes, tandis que le troisième ne porte (en plus de sa paire de pattes) qu'une paire de petits appendices dorsaux appelés haltères. Pour des raisons de facilité, nous utiliserons dans la suite les termes usuels de *mésothorax* pour parler du deuxième segment thoracique, et de *métathorax* pour parler du troisième (du grec meso : au milieu, et meta : après, au-delà).

Une observation attentive du mutant *bx* montre que la transformation affecte seulement la partie antérieure du métathorax (haltères et troisièmes pattes). Ce détail a pris tout son sens lorsqu'on a découvert l'existence de compartiments au sein des segments. En effet, il est alors apparu que la mutation *bx* transforme l'entièreté du compartiment métathoracique antérieur en compartiment mésothoracique antérieur. Il existe, par ailleurs, une autre mutation appelée *postbithorax* (*pbx*) qui

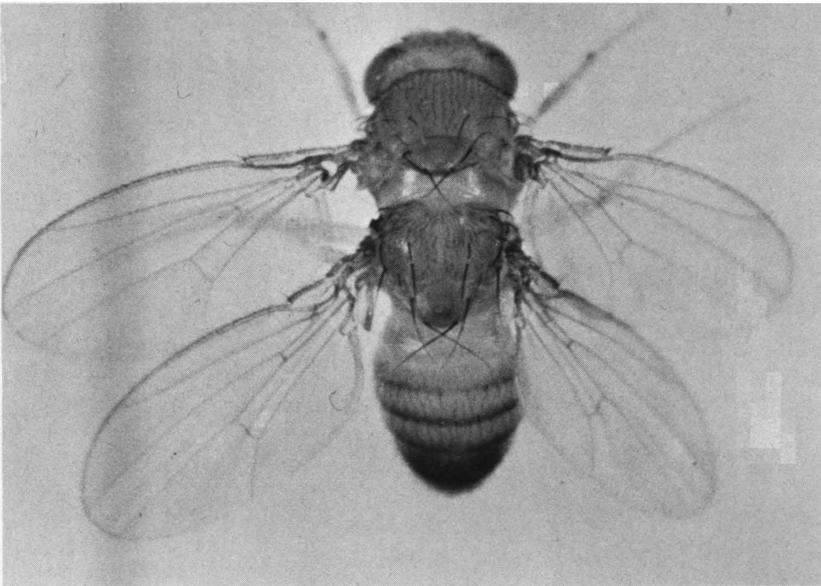
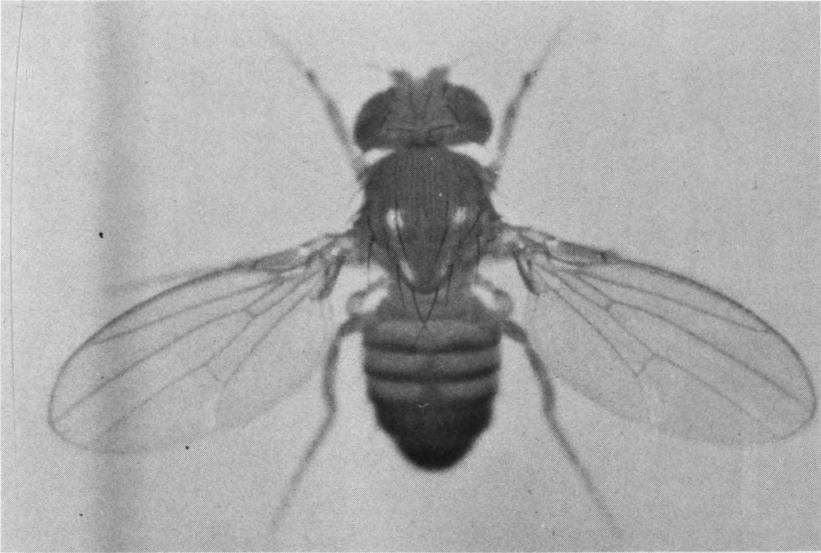


FIGURE 2.— Effets des mutations *bx* et *pbx* sur la morphologie d'une drosophile. a) Individu normal. b) Individu homozygote pour les deux mutations *bx* et *pbx*.

transforme parallèlement l'entièreté du compartiment métathoracique postérieur en compartiment mésothoracique postérieur. Un individu homozygote pour les deux mutations a donc l'ensemble du segment méthathoracique transformé en mésothorax (Fig. 2). Ceci suggère que les gènes bx^+ et pbx^+ sont nécessaires au développement normal du méthathorax et qu'en leur absence les cellules épidermiques du troisième segment thoracique suivent un autre chemin de développement qui les conduit à la formation d'un mésothorax.

On peut alors se demander à quel niveau agit le gène bx^+ : conditionne-t-il globalement le troisième segment antérieur, ou confère-t-il l'identité méthathoracique à chaque cellule individuellement ? Il est facile de répondre à cette question essentielle en produisant, par recombinaison mitotique, des clones homozygotes pour la mutation dans un individu hétérozygote, donc morphologiquement normal. Le résultat de telles expériences est clair : même si le clone homozygote est petit, toutes les cellules qui le composent montrent le caractère transformé lorsque le clone est présent dans le segment métathoracique. Comme on pouvait s'y attendre, les clones situés dans d'autres segments sont parfaitement normaux. On peut en conclure que la fonction bx^+ est requise dans chaque cellule du compartiment antérieur du troisième segment thoracique pour que ces cellules suivent la voie de développement normale menant à la formation d'un métathorax.

Qu'en est-il des autres segments ? Il existe en fait une série d'autres mutations qui toutes modifient la détermination des segments thoraciques et abdominaux, comme le montre la table 1. On possède actuellement des mutants montrant à peu près toutes les transformations possibles entre les segments mésothoracique, métathoracique et les premiers segments abdominaux. Certaines sont spectaculaires : outre le double mutant $bx\ pbx$, que nous avons déjà mentionné, signalons la mutation bithoraxoid (bxd), qui entraîne l'apparition d'une quatrième paire de pattes (par transformation du premier segment abdominal en métathorax), la mutation Contrabithorax (Cbx) qui entraîne la disparition de la boîte thoracique et la réduction des ailes en haltère (par transformation du mésothorax en métathorax), et Hyperabdominal (Hab) qui produit des mouches à deux paires de pattes (par transformation du métathorax en premier segment abdominal). Nous verrons dans la section suivante comment cette apparente cacophonie segmentaire a servi de base à un modèle magnifiquement simple.

TABLEAU 1.— Mutations du locus bithorax.

MUTATION	SYMBOLE	TRANSFORMATIONS
antérobithorax	abx	AMT → AMS
bithorax	bx	AMT → AMS
postbithorax	pbx	PMT → PMS
bithoraxoid	bx _d	AB1 → MT
Ultrabithorax	Ubx	MT, AB1 → MS
infra-abdominal 2	iab-2	AB2 → AB1
infra-abdominal 5	iab-5	AB5 → AB4
Contrabithorax	Cbx	MS → MT
Hyperabdominal	Hab	MT → AB1
Ultraabdominal	Uab	AB1, AB2 → AB3
Miscadestral	Mcp	AB4 → AB5

Légende du Tableau 1 : Les mutations sont classées dans l'ordre du ou des segments affectés ; le premier groupe contient les mutations qui entraînent une perte de fonction ; le deuxième groupe contient les mutations qui entraînent un excès de fonction. Abréviations : AB1, AB2 ... premier, deuxième ... segment abdominal, AMS : compartiment antérieur du mésothorax, AMT : compartiment antérieur du métathorax, PMS : compartiment postérieur du mésothorax, PMT : compartiment postérieur du métathorax.

Aucune de ces mutations n'a été étudiée aussi complètement que *bx* ; néanmoins, pour autant qu'on puisse le dire, elles partagent les mêmes propriétés essentielles : elles sont spécifiques d'un segment (ou d'un compartiment de segment), elles sont autonomes cellulaires et elles produisent leur effet tout au long du développement. Toutes ces mutations sont localisées sur un même chromosome (le troisième), extrêmement proches les unes des autres ; et leur ordre sur le chromosome correspond à celui des segments qu'elles affectent (Fig. 3). Cet ensemble de «gènes» étroitement liés sur le chromosome et assurant des fonctions similaires a été appelé «complexe bithorax» (BX-C).

Il faut distinguer deux types, parmi ces diverses mutations : celles du type *bx* (*pbx*, *bx_d*, *iab-2*, *iab-5*), entièrement récessives, transforment toutes un segment en celui qui lui est antérieur ; celles du type *Cbx* (*Hab*, *Uab*, *Mcp*), dominantes, transforment toutes (à une exception près) un segment en celui qui lui est postérieur. L'exception est la mutation Ultrabithorax (*Ubx*), qui s'est avérée dominante par haplo-insuffisance. Les mutations du premier type étant récessives, correspondent probablement à la perte d'une fonction. Par contre, les mutations du second groupe correspondraient à l'expression anarchique ou excessive d'une fonction.

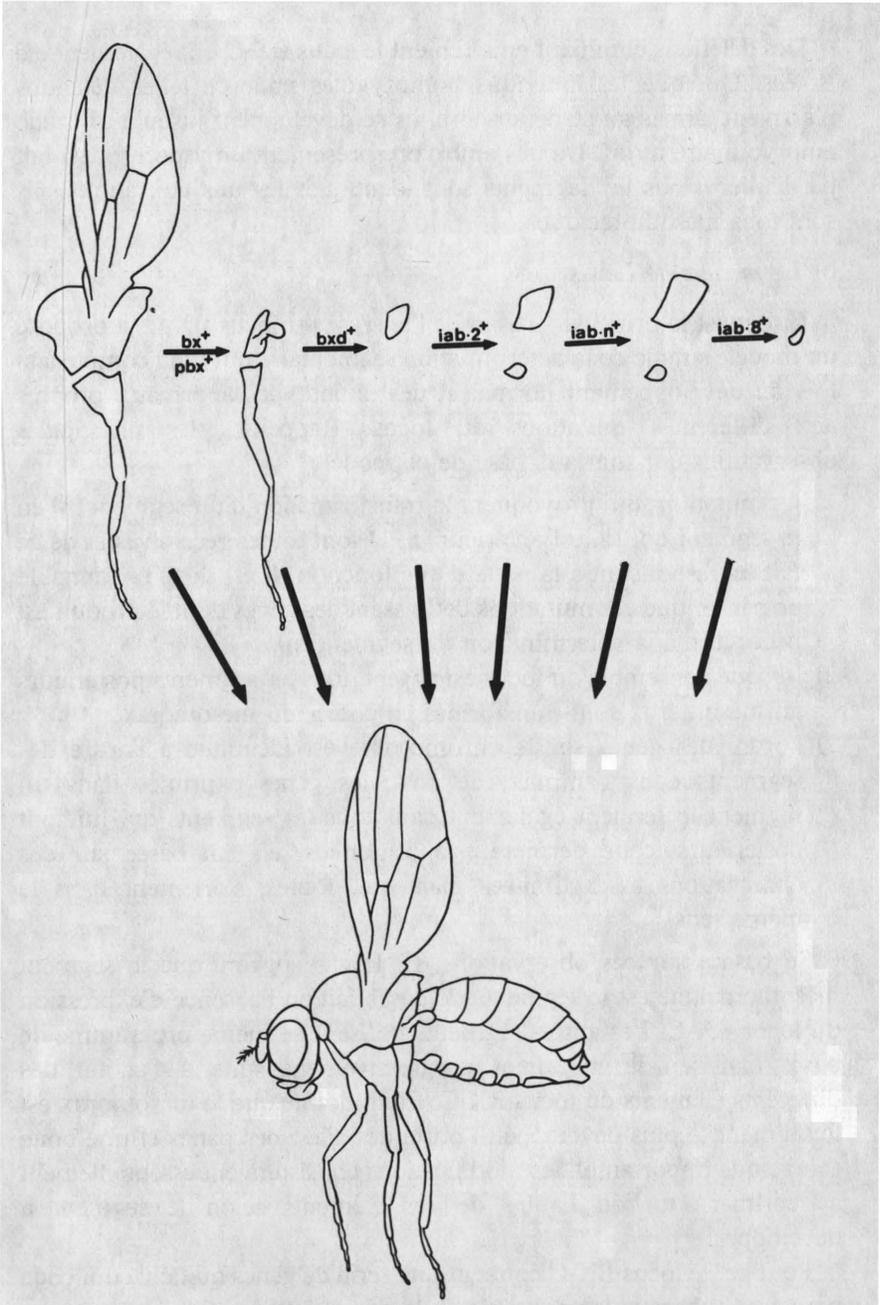


FIGURE 3.- Le modèle de Lewis. On a représenté les différents éléments externes dont est composé le corps de l'adulte. Tous ces éléments sont construits à partir d'un même programme de base qui est progressivement modifié, suite à l'action des différents gènes du locus bithorax. Le nom de chaque gène est indiqué au-dessus de la flèche qui représente la modification dont il est responsable.

Des délétions éliminant entièrement le locus BX-C ont également été isolées. Quoique les individus homozygotes pour de telles délétions n'arrivent jamais au stade larvaire, ils se développent jusqu'à un stade embryonnaire tardif. De tels embryons présentent un aspect tout à fait particulier : tous les segments sont identiques les uns aux autres ; ils sont tous mésothoraciques.

b) *Le modèle de Lewis*

E. Lewis, le principal artisan de l'analyse du locus BX-C, a proposé un modèle simple de la détermination segmentaire qui rend compte à la fois du développement normal et des phénotypes anormaux propres aux différentes mutations du locus. Rappelons les principales observations qui sont à la base de ce modèle :

- 1) les mutations qui provoquent la transformation d'un segment (n) en le segment qui lui est antérieur (n-1) sont toutes récessives et de ce fait correspondent à la perte d'une fonction. Il est donc raisonnable de penser que ces mutations définissent des gènes dont le produit est nécessaire à la détermination du segment (n).
- 2) lorsque l'ensemble du locus est absent, tous les segments postérieurs au mésothorax sont transformés en copies du mésothorax.
- 3) l'ordre des gènes sur le chromosome est identique à l'ordre des segments dans l'animal ; de plus, les gènes exprimés dans un segment le seraient également dans tous les segments qui lui sont postérieurs (cette dernière proposition est en fait basée sur des observations assez limitées mais qui, toutes, s'orientent dans le même sens).

Se basant sur ces observations, E. Lewis suggère que le segment mésothoracique est le segment «de base» fait en l'absence d'expression du locus BX-C. Les autres segments utilisent ce même programme de base, mais en le modifiant progressivement suite à l'action des différents éléments du locus BX-C. Etant donné que le mésothorax est le segment le plus développé (il porte des ailes, des pattes et une boîte thoracique importante), les modifications consisteraient essentiellement à réprimer l'un ou l'autre de ces éléments selon le segment à développer.

Pour ce, le locus BX-C contient une série de gènes qui, chacun, code pour une substance responsable de la détermination d'un segment. Le fait qu'il existe une colinéarité impressionnante entre l'ordre de ces gènes et l'ordre des segments, indique que l'expression des gènes

procède du plus proximal au plus distal par rapport au centromère. Une fois qu'un gène est exprimé dans un segment, il le reste dans tous les segments postérieurs et la morphologie d'un segment résulte de la combinaison des substances présentes. Ainsi, la réalisation du segment métathoracique à partir du segment mésothoracique nécessite l'expression des premiers gènes du locus (bx^+ , pbx^+), celle du premier segment abdominal nécessite de plus l'expression du gène adjacent bx^d^+ , celle du 2^e segment abdominal requiert l'expression du gène suivant $iab-2^+$ et, finalement, celle du 8^e segment abdominal dépend de l'expression de l'entièreté du locus.

Lorsqu'un de ces gènes est muté, par exemple bx , la modification du programme de base (mésothoracique) ne peut plus se faire et il apparaît deux segments mésothoraciques consécutifs au lieu d'un segment mésothoracique et un segment métathoracique. Par contre, lorsqu'un de ces gènes s'exprime dans un segment où il est normalement inactif (tels les gènes bx^+ , pbx^+ dans le mésothorax en présence de la mutation Cbx), on constate la transformation du segment en un segment postérieur (apparition de deux segments métathoraciques chez le mutant Cbx à la place des segments mésothoracique et métathoracique) (Fig. 4).

En conclusion, la détermination segmentaire est une propriété irréversible, acquise par chaque cellule au début du développement embryonnaire, et transmise par cette cellule à toute sa descendance. Cette détermination traduit simplement l'état d'activité des différents gènes du locus BX-C : si aucun gène n'est actif, la cellule est définie comme mésothoracique, si les premiers gènes du locus sont actifs, elle est définie comme métathoracique, et ainsi de suite. Au moment de la métamorphose, l'activité des gènes dits «réalisateurs», responsables de la formation des structures différenciées, sera modulée par les gènes du locus BX-C de manière que les cellules des différents segments produiront les structures caractéristiques de chacun de ces segments.

On voit qu'il y a une similitude frappante entre la détermination segmentaire et la compartimentation : la division d'un segment en compartiments se présente en fait comme la suite logique de la segmentation. Il semble donc que la manière dont les gènes mènent à bien l'impossible tâche de construire un organisme est de le fragmenter en petites «unités de développement», chacune définie par l'activité d'un ou de quelques gènes de contrôle. Chacune de ces unités met en oeuvre le même programme de développement, modulé dans des

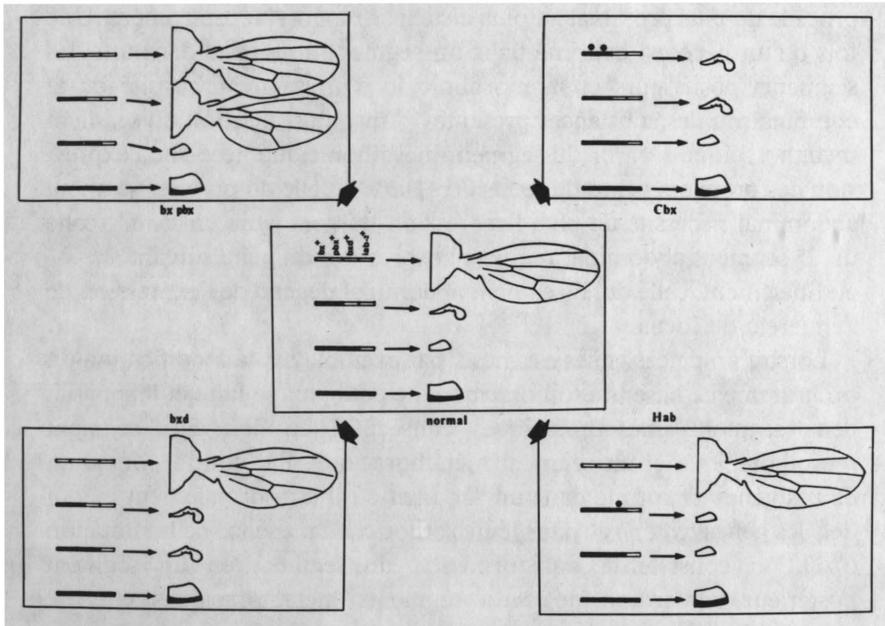


FIGURE 4.- Interprétation de différents mutants homéotiques selon le modèle de Lewis. Au centre, l'état d'expression des gènes dans un individu normal : un gène est représenté en blanc lorsqu'il est réprimé, en noir lorsqu'il est actif. Dans les deux panneaux de gauche, on a montré l'effet de mutations récessives (*bx pbx* et *bx d*) : les gènes correspondants sont inactifs (hachurés) dans des segments où ils devraient être exprimés, et ces segments sont donc transformés en segments antérieurs. Dans les deux panneaux de droite, effet des mutations dominantes *Cbx* et *Hab* : les gènes *bx**, *pbx** et *bx d** sont actifs (astérisque) dans les segments où ils ne devraient pas l'être, et ces segments sont dès lors transformés en segments postérieurs.

directions différentes par le ou les gènes de contrôle actifs dans cette unité, et l'assemblage de ces fragments de tailles et de morphologies diverses donne finalement l'adulte tel que nous le voyons.

5. LA RÉGULATION DU LOCUS BITHORAX

a) Les gènes régulateurs

Selon le modèle de Lewis, l'état exprimé ou éteint des différents gènes du locus détermine l'identité segmentaire de la cellule. On se demande alors par quel processus l'expression de ces gènes est enclenchée dans certaines parties de l'embryon et pas dans d'autres. Par

exemple, pourquoi les gènes *bx*⁺ et *pbx*⁺ sont-ils actifs dans les cellules du métathorax (et des segments suivants) et inactifs dans le mésothorax ? Deuxième question liée à la première : quel est le mécanisme qui, dans un même segment, assure l'expression de certains gènes du locus et l'extinction d'autres ? Par exemple, pourquoi dans les cellules du métathorax, les gènes *bx*⁺ et *pbx*⁺ sont-ils actifs alors que *bxd*⁺ (et les gènes suivants) sont inactifs ? Il apparaît clairement que l'expression des gènes du locus BX-C est elle-même contrôlée par d'autres éléments, et un problème majeur est de savoir comment.

Ce problème a été magistralement étudié par A. Garcia-Bellido, qui en est arrivé à proposer un modèle répondant à ces différentes questions. Ce modèle rend compte d'un vaste ensemble de données et propose un mécanisme simple et plausible pour l'établissement de la détermination segmentaire. Garcia-Bellido a mis en œuvre deux méthodes extrêmement ingénieuses pour détecter des gènes situées en dehors du locus BX-C et qui interviendraient dans son contrôle. Ces méthodes, que nous ne pouvons malheureusement pas résumer ici, ont mis en évidence deux gènes, Polycomb (*Pc*) et Régulateur-de-bithorax (*Rg-bx*). Les mutations *Pc* et *Rg-bx* sont dominantes par haplo-insuffisance, et montrent à l'état hétérozygote des propriétés inverses : *Pc* entraîne une légère transformation du mésothorax vers le métathorax, tandis que *Rg-bx* provoque l'apparition, au sein du métathorax, de plages mésothoraciques. Des individus homozygotes pour la mutation *Pc* ne se développent que jusqu'à un stade embryonnaire tardif, où ils manifestent une transformation extrême : tous les segments thoraciques et abdominaux sont transformés en huitième (dernier) segment abdominal. On en conclut que lorsque le gène *Pc*⁺ est inactivé par une mutation, tous les gènes du locus BX-C sont exprimés dans tous les segments, et par conséquent que le produit du gène *Pc*⁺ est nécessaire pour réprimer les gènes BX-C dans les segments où ils doivent l'être. La mutation *Rg-bx*, à l'état homozygote, entraîne aussi la mort à la fin du stade embryonnaire ; cependant, on a isolé récemment d'autres mutations qui n'inactivent que partiellement ce gène. Des individus homozygotes pour de telles mutations peuvent occasionnellement atteindre l'état adulte. Ces adultes présentent des plages de transformation, non seulement du métathorax vers le mésothorax, mais aussi de tous les segments abdominaux vers des segments qui leur sont antérieurs. Ceci suggère que, dans ces mutants, les gènes du locus BX-C sont mal exprimés dans les segments où ils

devraient l'être pleinement, et donc que le produit du gène *Rg-bx*⁺ est un inducteur nécessaire à l'activation des gènes du locus BX-C. De plus, les transformations sont beaucoup plus fréquentes et importantes si ces adultes homozygotes proviennent de mères elles aussi homozygotes pour ces mêmes mutations *Rg-bx* partielles, ce qui indique que l'œuf contient une certaine quantité de produit *Rg-bx*⁺ fournie par la mère : si celle-ci est mutante, la quantité de produit fournie sera moindre, ce qui accentuera les transformations observables dans sa descendance.

b) *Le modèle de Garcia-Bellido*

A partir des données mentionnées ci-dessus, A. Garcia-Bellido a conçu un modèle qui explique comment les différents gènes régulateurs contrôlent, dans le temps et dans l'espace, l'expression du locus BX-C (Fig. 5 et 6).

Le locus BX-C est contrôlé par deux molécules régulatrices : un répresseur codé par le gène *Pc*⁺ et un inducteur codé par le gène *Rg-bx*⁺ (Fig. 5). Le répresseur bloque l'expression des gènes du locus en se fixant en certains sites du locus. Ceci entraîne l'inactivité des gènes adjacents à ces sites. E. Lewis, dans son modèle de l'organisation du locus BX-C, propose que les différents gènes du locus ne sont pas également sensibles au répresseur : il faudrait une concentration élevée de ce dernier pour que les gènes localisés à l'extrême gauche du locus soient réprimés ; les gènes situés de plus en plus à droite du locus seraient réprimés en présence de quantités de plus en plus faibles de répresseur ; le dernier, celui qui n'est normalement exprimé que dans le huitième (dernier) segment abdominal, sera donc réprimé même en présence d'une quantité très faible de répresseur. On voit dès lors que la concentration en répresseur actif détermine indépendamment l'état réprimé ou non de chaque gène : si cette concentration est suffisamment élevée, aucun gène du locus n'échappera à la répression (niveau mésothoracique), si elle est un peu moindre, seul *bx*⁺ échappera à la répression (niveau mésothoracique antérieur), avec une concentration encore moindre, *pbx*⁺ à son tour sera exprimé (niveau mesothoracique postérieur), puis *bx^d*⁺ (niveau premier abdominal), et ainsi de suite jusqu'à ce que, pour une concentration très faible ou nulle en répresseur, tous les gènes du locus soient exprimés (niveau huitième abdominal). L'inducteur, quant à lui, activerait l'expression des gènes du locus BX-C en se combinant au répresseur et en l'inactivant. Selon

cette interprétation, l'expression des gènes du locus dépend de la concentration de répresseur libre dans la cellule, et par conséquent, des concentrations relatives du répresseur et de l'inducteur. Dès lors, pour expliquer comment l'expression du locus BX-C varie en fonction de sa position dans l'œuf, il faut postuler que la concentration d'une au moins des deux molécules régulatrices décroît progressivement d'un pôle à l'autre de l'œuf. L'effet maternel de *Rg-bx* suggère que c'est l'inducteur, et non le répresseur, qui remplit ce rôle. Dans ce système, ce serait donc la concentration d'inducteur qui informe la cellule de sa position dans l'œuf ; autrement dit, cette concentration permet une certaine expression du locus BX-C, et par là détermine l'identité segmentaire de la cellule.

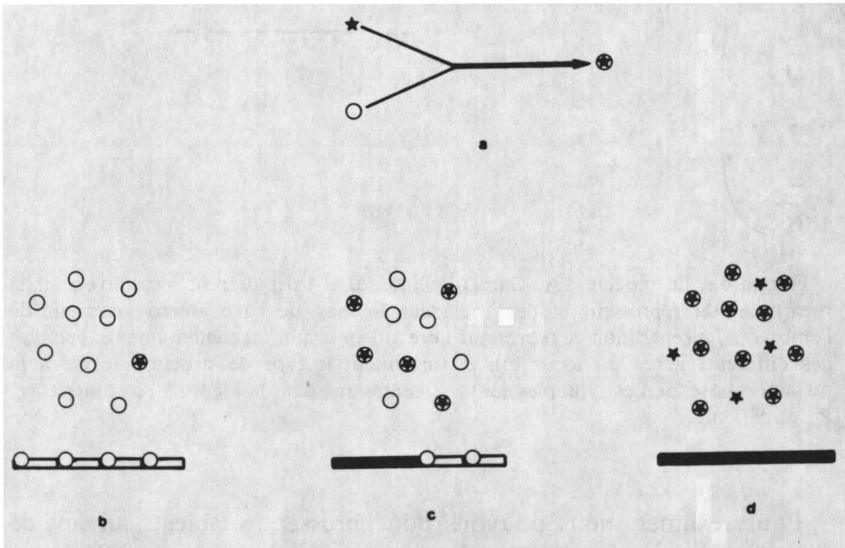


FIGURE 5.— Schéma illustrant l'expression du locus BX-C en fonction de la concentration de répresseur libre dans la cellule. Un gène est représenté en blanc lorsqu'il est réprimé, en noir quand il est actif. a) représentation de l'inactivation du répresseur (rond blanc) par l'inducteur (étoile) et formation d'un complexe répresseur-inducteur qui ne réprime plus. b) Lorsque le nombre de molécules d'inducteur est très faible, la plupart des molécules de répresseur sont actives : chaque gène du locus voit son site de contrôle occupé par une molécule de répresseur et reste donc inactif (blanc). c) la quantité d'inducteur étant plus élevée, le nombre de molécules de répresseur libre diminue, il n'y en a plus assez pour occuper les sites de contrôle des gènes de gauche qui deviennent donc actifs (noirs). d) Lorsque la quantité de molécules d'inducteur dépasse celle de répresseur, il ne reste plus de répresseur actif et tous les gènes du locus sont donc actifs (noirs).

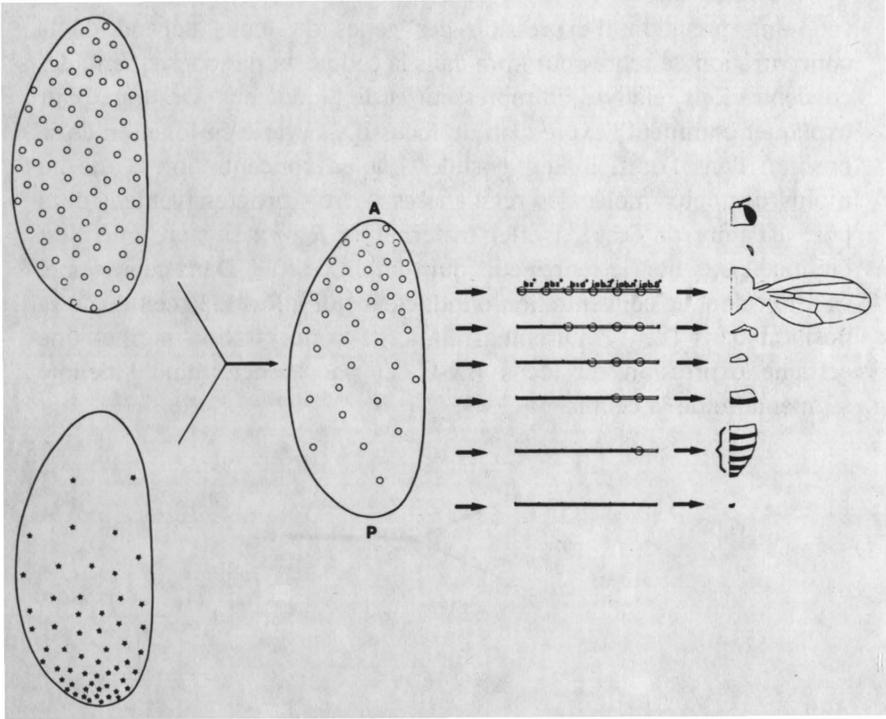


FIGURE 6.- Le modèle d'A. Garcia-Bellido. (a) et (b) montrent respectivement la répartition du répresseur et de l'inducteur le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. La répartition de répresseur libre qui en résulte (c) conditionne l'expression des différents gènes du locus (d), et finalement le type de structure formé à la métamorphose (e). Les symboles sont les mêmes que dans la Figure 5 ; a : antérieure, P : postérieure.

Pour résumer, nous pouvons donc dresser le tableau suivant de l'ensemble du processus. (Fig. 6). Lors de la formation de l'œuf, la mère y dépose un inducteur, le produit du gène *Rg-bx*. Cet inducteur est déposé dans la périphérie de l'œuf, en concentration croissante du pôle postérieur au pôle antérieur. On sait qu'après la fécondation de l'œuf, treize vagues de divisions successives génèrent à peu près six mille noyaux à partir du noyau initial résultant de la fusion des gamètes mâle et femelle. Vers la septième division, ces noyaux jusqu'alors ramassés au milieu de l'œuf migrent vers la périphérie où ils continuent à se diviser. Après la treizième division, à peine deux heures et demie après la fécondation, les noyaux s'allongent perpendiculairement à la surface

de l'œuf, des nucléoles y apparaissent, la membrane de l'œuf s'invagine, vient cloisonner les noyaux et finalement les entoure complètement, tandis que débute une active synthèse de protéines. On sait également, tant par des expériences génétiques que par des expériences de lésions ou de transplantation cellulaire, que c'est précisément à ce stade qu'a lieu la détermination segmentaire, alors même que les premiers signes de segmentation n'apparaissent que nettement plus tard dans l'embryogenèse. Selon Garcia-Bellido, c'est en effet à ce moment là que tout se joue : les noyaux commencent à produire du répresseur (le produit du gène *Pc*) lorsqu'ils atteignent la périphérie. Peu après, les cellules se forment : dans chaque cellule s'établit le bilan entre la quantité de répresseur (constante pour toutes les cellules) et la quantité d'inducteur (qui dépend de la position de cette cellule le long de l'axe antéro-postérieur). C'est à ce moment précis que s'initie la détermination segmentaire : dans la tranche de l'œuf où la quantité d'inducteur est très élevée (pôle postérieur), toutes les molécules de répresseur seront inactivées : tous les gènes du locus seront exprimés, ces cellules auront acquis la détermination «huitième abdominal». Au fur et à mesure qu'on s'éloigne du pôle postérieur, la concentration d'inducteur décroît, celle de répresseur actif augmente donc, et les gènes *iab-n*, ... *iab-2*, *bx*, *pbx* et finalement *bx* seront réprimés chacun à leur tour : ces cellules auront respectivement acquis la détermination nième abdominal, deuxième abdominal, premier abdominal, métathoracique postérieur, métathoracique antérieur et finalement mésothoracique.

6. L'APPROCHE MOLÉCULAIRE

Sans doute ne sommes nous pas parvenus, dans cette revue, à transmettre l'émerveillement que l'on ressent à voir comment des chercheurs tels qu'E. Lewis et A. Garcia-Bellido sont parvenus à mettre de l'ordre dans un amas aussi hétéroclite de données, et à dégager progressivement une image claire du processus de détermination segmentaire. En effet, une fois que les traits significatifs sont mis en évidence, que les expériences critiques sont réalisées, que les phénotypes mutants sont présentés dans la bonne perspective, l'ensemble de l'argumentation paraît couler de source. On en oublie alors l'énorme somme d'ingéniosité et d'imagination qui a été requise pour atteindre ce résultat : la fabrication de chromosomes fusionnés

pour permettre la localisation précise des mutations dans le locus (elles sont à ce point proches les unes des autres qu'on trouve en moyenne quelques recombinants sur 100.000 mouches !), l'étude d'embryons létaux, l'introduction de l'analyse clonale dans l'étude du développement, l'analyse génétique des phénocopies et bien d'autres encore. Certes, la question se pose de savoir si ces modèles sont corrects ou non, et nous y reviendrons dans un instant, mais en tout état de cause, ces travaux constituent par eux-mêmes trois apports importants dans l'étude du développement : ils ont montré qu'il est possible de s'attaquer fructueusement à une question essentielle dont personne ne voyait très bien comment l'aborder : la détermination cellulaire et sa base génétique ; ils forment une base précise susceptible d'être mise à l'épreuve, modifiée, améliorée ; et enfin, ils ont réuni un ensemble de matériel génétique qui fait de ce système un des meilleurs pour une étude moléculaire.

Nous avons posé la question de savoir si ces modèles étaient corrects. Se pourrait-il qu'ils ne le soient pas ? C'est concevable, dans la mesure où tous les résultats ne nous renseignent qu'indirectement sur ce qui se passe au niveau moléculaire : la génétique est une science formelle et elle ne pourra jamais prouver ou improuver un mécanisme précis. C'est peu probable, cependant, étant donné le remarquable faisceau de présomptions dont nous avons résumé l'essentiel. Ce qui semble très possible, par contre, c'est que ces modèles soient corrects dans leur essence mais qu'il nous manque encore un pan de la réalité. Ceci est suggéré d'une part, par certains résultats génétiques qui ne sont pas faciles à interpréter dans ce cadre, et d'autre part, par les tout récents résultats de l'analyse moléculaire du locus.

Les résultats génétiques d'abord : nous avons mentionné les mutations *Ubx* sans nous y attarder. Ces mutations sont très curieuses : elles se comportent en fait comme si elles étaient à la fois *bx*, *pbx* et *bxd*. Quelle pourrait être la fonction de ce gène ? De plus, l'ordre des gènes dans le locus ne suit pas rigoureusement l'ordre des segments : en effet, *bxd* est localisé à gauche de *pbx*. C'est l'unique exception, quelle est sa signification ? D'autre part, il y a d'autres gènes extérieurs au locus, hormis *Pc* et *Rg-bx*, qui semblent également intervenir dans le processus de détermination segmentaire : on ne voit pas clairement quel pourrait être leur rôle.

Les résultats moléculaires : rien n'est encore publié mais il apparaît que le locus BX-C est immense (plus de 300.000 paires de bases, alors

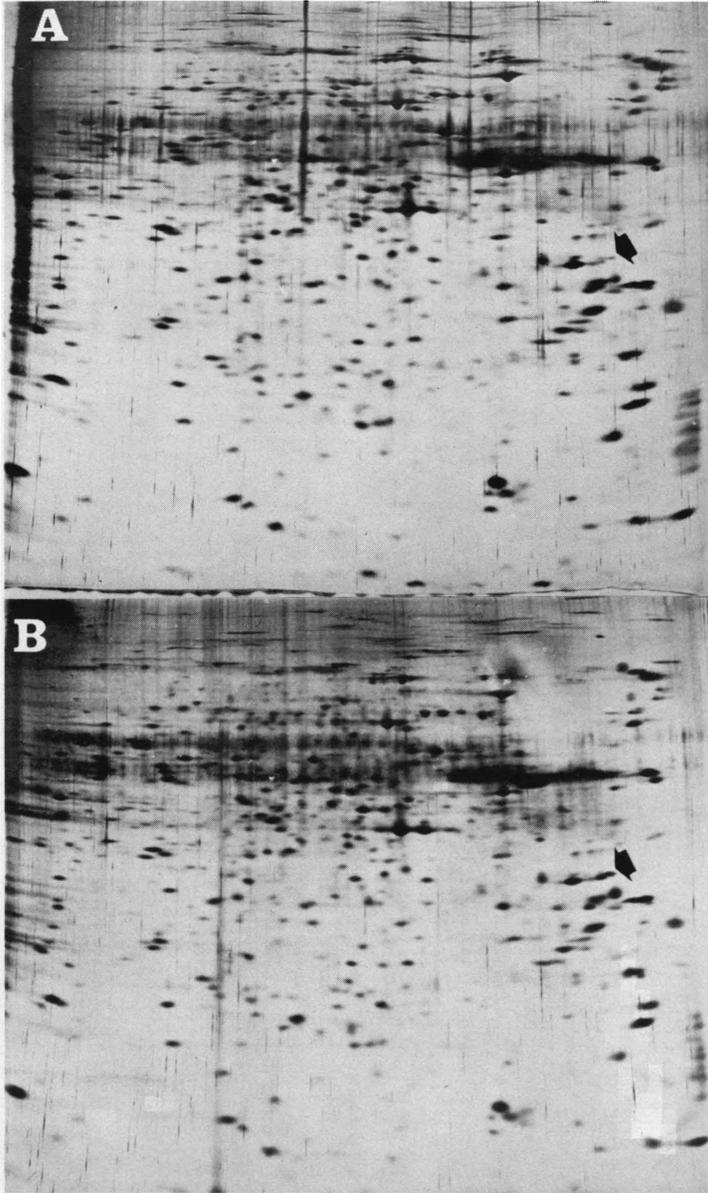


FIGURE 7.— Electrophorèses en deux dimensions montrant les protéines d'un disque d'aile (A) et d'un disque d'haltère (B). Cette méthode sépare les protéines selon leur charge électrique (horizontalement : les protéines les plus acides sont à droite, les plus basiques sont à gauche) et selon leur poids moléculaire (verticalement : les protéines les plus légères se retrouvent vers le bas, les plus lourdes restent vers le haut). Cette méthode permet de distinguer un millier de protéines différentes dans des extraits de disques imaginaires. Dans le cas des disques d'aile et d'haltère, l'ensemble des protéines est identique à l'exception de deux ou trois différences dont la plus visible est marquée par une flèche.

qu'un gène bactérien moyen est codé par à peine mille paires de bases). Et pourtant, on n'a reéré jusqu'à présent que peu de messagers codés par le locus ; ensemble, ils correspondent à moins de dix mille paires de bases. Se pourrait-il que les multiples «gènes» du locus ne soient que des sites d'action qui, tous, contrôleraient la synthèse d'un même (ou de quelques) produits ? Les mutations *Ubx* se produisent n'importe où sur une distance d'à peu près septante mille paires de bases : comment l'interruption d'une aussi longue séquence peut-elle donner un même effet ? Enfin, presque toutes les mutations étudiées jusqu'à présent (plus de douze dont différentes mutations *bx*, *pbx* et *bx_d*) s'avèrent être des insertions de petits morceaux d'ADN en différents endroits du locus : est-ce parce que de simples changements de bases sont insuffisants pour affecter l'expression du locus ? On voit bien que l'histoire n'est pas terminée et que l'on peut encore s'attendre à pas mal de surprises.

L'approche moléculaire décrite ci-dessus est centrée sur l'analyse du locus BX-C lui-même. Nous avons choisi une autre voie qui est d'étudier l'ensemble des protéines synthétisées dans différents types de tissu. La raison de cette approche est que, de cette manière, on peut espérer détecter les différents éléments qui interviennent dans la détermination segmentaire alors que l'analyse de l'ADN est forcément limitée au seul gène qu'on choisit d'étudier. Nous avons la chance de disposer, dans cette étude, de deux techniques développées ces toutes dernières années : d'une part, une méthode qui permet de distinguer plus de 1.000 protéines différentes dans un extrait donné et, d'autre part, une méthode qui permet de détecter des protéines présentes en quantités aussi faibles qu'un millionième de gramme. La conjonction de ces deux techniques permet d'examiner séparément l'échantillon de protéines présentes dans tel ou tel disque imaginal, dans telle ou telle structure adulte, dans des embryons de tel ou tel génotype. Quoique ce travail n'en soit qu'à ses débuts, il nous a déjà appris 1) qu'il y a des différences substantielles entre l'ensemble des protéines présentes dans différents tissus, par exemple dans un disque imaginal et dans la structure adulte qui en dérive. Ceci montre que notre échantillonnage n'est pas limité à l'ensemble des protéines nécessaires à la vie cellulaire, qu'on s'attend à trouver également dans tous les tissus. 2) qu'il n'y a pratiquement aucune différence entre les différents disques imaginaires, ce qui indique que la détermination n'est pas liée à un changement notable de la composition en protéines. On peut dès lors espérer que les rares différences observables (voir Fig. 7), et d'autres que nous

pourrons peut-être détecter en regardant plus attentivement les protéines qui ont une affinité pour l'ADN, s'avèreront étroitement liées au contrôle ou à l'expression du locus bithorax.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier A. Garcia-Bellido et E. Lewis pour les multiples et toujours passionnantes discussions que nous avons eues, et R. Thomas pour l'intérêt qu'il a toujours porté à notre travail. C. D.-C. est chef de travaux à l'U.L.B., A.G. est chercheur qualifié au F.N.R.S.

RÉFÉRENCES

- E. B. LEWIS.— «A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*». *Nature*, vol. 276, pp. 565-570, 1978.
- A. GARCIA-BELLIDO, P. A. LAWRENCE, G. MORATA.— «Compartments in animal development». *Scientific American*, vol. 241, pp. 90-98, juillet 1979.
-

Titre XIV

Le câblage du système nerveux

«The most incomprehensible thing about the universe is that it is comprehensible».

Einstein

RÉSUMÉ.

Les cellules du système nerveux, les neurones, sont reliées entre elles par un incroyable enchevêtrement de fibres, dont chacune est rigoureusement programmée pour atteindre une cible donnée. Nos travaux sur la drosophile suggèrent que les moyens mis en œuvre pour atteindre une aussi délicate précision, et construire un ensemble d'une aussi incroyable complexité, sont en fait très simples.

1. LE PROBLÈME

Comme tous les tissus vivants, le système nerveux est composé de cellules. Ce qui le distingue essentiellement des autres tissus, c'est que les cellules nerveuses (neurones) sont pourvues de fins prolongements (axones) qui leur permettent de se connecter les unes aux autres. Les connexions ne se font pas au hasard : chaque axone relie le neurone dont il est issu à un, ou à un petit nombre d'autres neurones, parfois tout proches, parfois fort éloignés. Un axone dont la cible est située à un endroit très différent du système nerveux peut ainsi parcourir d'énormes distances, et côtoyer des millions d'autres fibres et d'autres neurones sur son chemin ; il aboutira néanmoins inmanquablement à son but, et n'établira de contact qu'avec un groupe de neurones bien précis. C'est ce réseau de connexions, essentiellement identique pour des animaux d'une même espèce, qui sous-tend tous les comportements instinctifs, toutes les sensations et toutes les opérations mentales innées. L'ensemble des fils reliant transistors, condensateurs, résistances et capacités d'un poste radio est appelé le câblage, et par analogie on peut aussi parler du câblage du système nerveux pour désigner le réseau de

fibres qui relie les neurones les uns aux autres. On sait, bien sûr, qu'un câblage correct est essentiel pour qu'un poste radio fonctionne. Mais pour le système nerveux, le câblage est plus important encore. En effet, contrairement aux différents éléments d'une radio, les cellules nerveuses fonctionnent toutes de la même manière : elles mesurent les signaux qu'elles reçoivent de certains neurones, et décident en conséquence si elles-mêmes enverront des signaux à d'autres neurones. Ces signaux sont toujours de petites impulsions électriques, d'intensité et de durée constantes, quel que soit le neurone, quel que soit l'animal. Les signaux que l'on peut intercepter dans le nerf optique du lecteur de cette revue, ou dans le nerf sciatique du même lecteur lorsqu'il se cogne un orteil, ou dans le nerf d'aile d'une mouche qui vole, ces signaux sont tous identiques (la seule différence pouvant exister est la fréquence de ces impulsions, qui traduit simplement l'intensité de l'excitation). Il n'y a donc rien, ni dans la fonction du neurone ni dans le signal qu'il transmet, qui distingue les neurones impliqués dans la lecture, dans la perception de la douleur, ou dans le vol : seules les connexions qu'ils établissent distinguent ces neurones les uns des autres.

La complexité du réseau de connexions nécessaire à la fonction nerveuse peut être illustrée par une description schématique du système visuel. Les cellules photoréceptrices de la rétine, capables de transformer une stimulation lumineuse en impulsion électrique, contactent différents neurones de deuxième ordre, eux-mêmes interconnectés par d'autres neurones. Ces neurones de deuxième ordre établissent à leur tour des contacts avec des neurones de troisième ordre, toujours dans la rétine. Ces derniers, eux aussi interconnectés par d'autres neurones, envoient leurs signaux par de longues fibres (qui composent le nerf optique) vers la zone occipitale du cerveau. La zone occipitale est chargée de l'analyse primaire du message visuel, on y compte à peu près sept cents neurones pour chaque axone venant d'un neurone de la rétine ! Là, les informations venant de la rétine sont soumises à de nombreuses transformations : certains neurones analysent l'orientation du stimulus visuel, d'autres, son mouvement, d'autres encore sont sensibles au contraste entre régions claires et régions sombres ... De cette zone partent de nouvelles séries de fibres dont certaines aboutissent dans d'autres zones visuelles (périoccipitales) chargées d'analyses plus spécialisées du message visuel : zones responsables de la perception de la couleur, du mouvement, de la distance ... Et pourtant, chacun de ces millions de neurones a pour

seule fonction de faire le compte des impulsions qui lui parviennent, et d'envoyer lui-même des impulsions vers d'autres neurones. Tout le raffinement de l'analyse du message visuel, sa décomposition selon différents modes (forme, contraste, couleur, distance, mouvement) et toutes les étapes encore inconnues qui permettent la représentation consciente du monde extérieur, tout cela vient exclusivement de l'exquise précision avec laquelle les connexions entre neurones sont établies.

Les principes qui président à l'établissement de connexions nerveuses spécifiques sont encore inconnus. Cela est dû à deux raisons majeures : d'une part, on connaît encore très mal les règles qui régissent les interactions cellulaires en général, et d'autre part le réseau formé par l'ensemble des connexions neuronales est d'une complexité qui semble défier l'analyse. Il suffit de mentionner que le système nerveux de l'homme contient au moins dix milliards de neurones et probablement bien plus, dont chacun est connecté spécifiquement à quelques dizaines ou quelques centaines d'autres ! Si l'on veut arriver à dégager les principes essentiels de construction du système nerveux, il est donc crucial de trouver un système expérimental où ces deux difficultés majeures peuvent être contournées, au moins partiellement. Aussi surprenant que cela puisse paraître, une petite mouche, la drosophile, possède des avantages déterminants pour cette étude. Il nous faut donc d'abord présenter au lecteur notre animal favori, ce qui permettra à la fois de voir en quoi ce système est particulièrement approprié, et de comprendre les expériences décrites plus loin, expériences qui ont mis en lumière certaines constantes dans la manière dont les axones atteignent leur cible.

2. POURQUOI LA DROSOPHILE ?

La drosophile, qui tire son nom (amie de la rosée) de ce qu'elle éclôt généralement à l'aube, est également appelée mouche du vinaigre, mouche des celliers, et en anglais fruitfly. Ces différents noms traduisent son attirance pour tout ce qui fermente ou pourrait fermenter, et donc tout ce qui contient de la levure, sa nourriture exclusive. Comme tous les insectes à métamorphose complète, la drosophile passe la première partie de son existence sous forme d'une larve, très semblable aux asticots (larves de mouches à viande) mais beaucoup plus petite : une larve prête à se métamorphoser mesure un

peu moins de deux millimètres, comme la mouche adulte. La vie larvaire dure quatre jours, dans les meilleures conditions, après quoi la larve se transforme en pupe : son épiderme secrète une coque dure et sombre, à l'abri de laquelle a lieu la métamorphose. Après cinq jours, une drosophile adulte éclôt de la pupe. Cette drosophile pourra encore vivre plusieurs mois, mais elle a d'emblée sa forme et sa taille définitives : les petites mouches ne sont pas, comme le croient certains étudiants, des bébés de grosses mouches !

Un des avantages majeurs des insectes, pour l'étude du système nerveux, vient de ce que leurs neurones sensoriels – les neurones directement responsables des sensations – sont localisés à proximité immédiate des organes sensoriels eux-mêmes. Pour prendre un exemple, les soies qui recouvrent le corps de beaucoup d'insectes sont des organes sensoriels : le moindre mouvement de ces soies est immédiatement perçu. On a pu montrer qu'à la base de chaque soie se trouve un neurone qui transforme l'excitation mécanique du mouvement de la soie en impulsion électrique. Or, les soies elles-mêmes (et les organes sensoriels en général) sont placées à des endroits bien précis du corps, constants chez tous les individus d'une même espèce. C'est ainsi que notre drosophile (*Drosophila melanogaster*) porte onze paires de grandes soies sur le thorax, chacune aisément identifiable par sa position. On peut donc choisir une soie donnée – et partant, un neurone donné – et la repérer avec certitude sur n'importe quel individu. Ceci permet d'étudier une série de neurones bien définis, plutôt que de devoir étudier des groupes de neurones dont on n'est jamais sûr qu'il s'agit bien des mêmes d'un animal à l'autre. De plus, la localisation du neurone sensoriel juste à la base de la soie est extrêmement avantageuse d'un autre point de vue. Il existe en effet une technique permettant de colorer l'ensemble d'un neurone donné, y compris les moindres branches de son axone, mais cette technique impose de faire pénétrer une substance dans le neurone, ce qu'on fait généralement par injection. Cette technique, irremplaçable pour l'étude du câblage, serait inutilisable s'il fallait injecter la substance dans les neurones sensoriels, généralement très petits. Heureusement, nous avons pu montrer qu'il suffisait d'arracher une soie pour exposer le neurone sous-jacent et permettre ainsi à la substance d'y pénétrer. Il nous est donc possible, moyennant un peu d'habileté manuelle, de colorer dans sa totalité un neurone identifiable, et partant, de voir dans quelle mesure ce neurone établit toujours les mêmes connexions, si son axone suit toujours le

même chemin au sein du système nerveux central, ce qui se passe si l'on oblige l'axone à changer de route, etc ...

La situation est complètement différente chez les vertébrés : là, les neurones sensoriels sont rassemblés dans des ganglions situés près de la colonne vertébrale ; rien ne permet dans ces ganglions d'identifier certains neurones et de les reconnaître d'un animal à l'autre ; et enfin l'arrangement des organes sensoriels à la surface du corps n'est pas rigidement défini. Il n'y a donc aucune façon d'identifier un neurone donné, ni par sa position, ni par l'organe sensoriel qu'il innerve. L'étude de la drosophile permet donc de réduire un des deux problèmes majeurs énoncés plus haut : certes, le système nerveux de cet insecte contient des dizaines de milliers de neurones et sa complexité globale reste redoutable, mais nous pouvons sélectionner pour notre étude quelques neurones identifiables à coup sûr, et voir si certains principes généraux émergeront de cette étude.

L'autre avantage majeur du système que nous utilisons, et cette fois c'est un avantage propre à la drosophile, est le niveau incomparable qu'a atteint son étude génétique. La raison en est très simple : c'est la drosophile qu'a choisie T. H. Morgan pour mener son travail de pionnier, et ce pour une série de raisons aussi bonnes en 1928 qu'elles l'étaient au début du siècle : temps de génération très court (dix jours, à comparer aux trois mois de la souris), fécondité élevée (une femelle peut être mère de centaines d'enfants), manipulation aisée (une loupe et un pinceau suffisent), encombrement réduit (une centaine de drosophiles tiennent à l'aise dans une petite bouteille de yoghourt), nourriture économique (sucre, levure et polenta). Toutes ces qualités, jointes au génie de Morgan et de son équipe, ont permis en quelques années un ensemble prodigieux de découvertes qui a transformé l'étude de l'hérédité en une science, la génétique. Depuis cette période initiale, de très nombreux chercheurs ont poursuivi et élargi ces études. Ceci a pour nous deux conséquences importantes : d'une part, le matériel disponible (mutations, réarrangements chromosomiques, chromosomes spécialement construits pour tel ou tel type d'expériences) est extrêmement riche, et permet de réaliser facilement des expériences qui seraient impensables avec n'importe quel autre organisme, comme on le verra plus loin. D'autre part, l'étude génétique du processus de développement – le processus qui assure la croissance harmonieuse d'un organisme, avec toute son incroyable complexité, à partir d'une cellule initiale, l'œuf fécondé – a permis de dégager certains principes

fondamentaux, dont on n'est à vrai dire pas encore sûr qu'ils soient applicables à tous les animaux. En effet, et c'est une indication du niveau d'analyse atteint chez la drosophile, non seulement ces principes fondamentaux n'auraient certainement pas pu être mis en évidence chez d'autres animaux, mais on n'a même pas les moyens de vérifier s'ils s'y appliquent ou non ! C'est en cela que l'utilisation de la drosophile permet de réduire l'autre problème majeur souligné plus haut : certes, le mécanisme des interactions cellulaires nous est encore tout aussi inconnu chez cet insecte que chez n'importe quel autre animal, mais au moins on y a dégagé certains des principes essentiels qui régissent ces interactions.

3. COMPARTIMENTS, SEGMENTS ET MUTATIONS HOMÉOTIQUES

Le lecteur est renvoyé au chapitre «La génétique de la détermination» pour une revue de nos connaissances actuelles du développement de la drosophile. Nous nous bornerons ici à rappeler les éléments nécessaires pour comprendre le reste de ce chapitre. Comme nous l'avons mentionné plus haut, la drosophile passe les premiers jours de son existence sous forme d'une larve vermiforme. Les cellules qui, pendant la métamorphose, formeront l'adulte, sont déjà présentes dans la larve sous la forme de petits amas cellulaires appelés disques imaginaux. Chaque disque imaginal se transformera, pendant la métamorphose, en une partie bien définie de l'adulte : tel deviendra une troisième patte, tel autre une aile et une demi boîte thoracique (les disques viennent tous par paires). Dans ces disques imaginaux, aucune cellule n'est encore différenciée : les cellules qui deviendront épiderme, celles qui deviendront neurones sensoriels, celles qui produiront les soies, sont toutes identiques : c'est seulement lors de la métamorphose qu'elles se différencieront, que les neurones sensoriels vont prendre leur forme caractéristique, et que leurs axones vont apparaître et croître jusqu'à rejoindre le système nerveux central. Cette particularité des insectes à métamorphose complète est très intéressante pour nous, car elle nous permet d'examiner une classe de neurones dont nous savons exactement à quel moment ils apparaissent au cours du développement.

L'autre élément que nous devons mentionner ici est l'existence, chez la drosophile, d'une série de mutations, dites homéotiques, qui transforment une partie du corps en une autre. Ces mutations présentent l'énorme intérêt qu'elles semblent affecter le processus de

détermination, de telle manière que des cellules qui devraient normalement produire une antenne, par exemple, se trompent et produisent une patte. Parmi ces mutations, les mieux étudiées sont celles qui transforment les segments thoraciques et abdominaux. Normalement, une mouche comprend trois segments thoraciques dont chacun porte une paire de pattes, le deuxième formant de surcroît l'essentiel de la boîte thoracique et les ailes, et le troisième portant une paire d'ailes extrêmement réduites appelées haltères. A ce thorax succède un abdomen formé de huit segments.

On connaît une série de mutations qui transforment ces segments les uns en les autres : par exemple, une de ces mutations, la mutation appelée bithorax, transforme le troisième en deuxième segment thoracique et donne donc une mouche qui possède deux boîtes thoraciques et deux paires d'ailes ; une autre opère la transformation inverse et donne une mouche sans ailes et pratiquement sans boîte thoracique, porteuse de deux paires d'haltères ; une troisième transforme le premier segment abdominal en troisième segment thoracique : ces mouches ont huit pattes, deux ailes et quatre haltères ; une quatrième a l'effet inverse et donne une mouche à quatre pattes et dépourvue d'haltères ... Toutes ces mutations, aux noms révélateurs à défaut d'être mélodieux (antérobithorax, Ultrabithorax, Contrabithorax, bithoraxoid, postbithorax, infraabdominal, Ultraabdominal, Hyperabdominal ...), sont localisées dans un locus appelé BX-C (complexe bithorax, voir le chapitre précité). On a pu «construire» des mouches où ce locus est absent : ces mouches montrent, à la fin du développement embryonnaire, une transformation du troisième segment thoracique et de tous les segments abdominaux en deuxième segment thoracique. Si de telles mouches arrivaient à l'état adulte, on pourrait donc observer de magnifiques spécimens pourvus de dix paires d'ailes et de onze paires de pattes. Malheureusement ces individus n'atteignent même pas le stade larvaire.

L'ensemble de ces mutations a été l'objet d'études remarquables qui ont permis de formuler un modèle dont nous allons tracer les grandes lignes (pour plus de détails, voir le chapitre précité). Selon ce modèle, le génome (l'ensemble des chromosomes) contiendrait un ensemble de gènes dont l'activité mène à la construction d'un segment de base. Dans le cas de la mouche, ce segment de base serait le deuxième segment thoracique. Par ailleurs, il existe un autre ensemble de gènes (les gènes du complexe bithorax) dont la fonction serait de modifier l'activité des

gènes du premier ensemble, de manière à produire des segments de plus en plus différents du segment de base. Tous les segments postérieurs au deuxième segment thoracique ne seraient donc que des variantes de celui-ci. C'est ainsi qu'un premier gène de ce locus aurait pour effet de modifier le programme de base de telle sorte que l'aile soit très réduite et modifiée en haltère : ce gène est actif dans le troisième segment thoracique. Un autre gène aurait pour fonction de supprimer ailes et pattes, ce gène sera actif dans les segments abdominaux, et ainsi de suite. Si une mutation réduit l'activité d'un de ces gènes, la fonction de ce gène, qui est de modifier d'une certaine manière le programme de base, ne sera pas remplie : le segment où ce gène devrait être actif va donc se développer comme s'il s'agissait d'un autre segment, généralement celui qui lui est antérieur. Si l'on enlève l'ensemble de ces gènes, tous les segments suivront le programme de base sans modification aucune : ces individus auront dix «deuxième» segments thoraciques.

Ce type de mécanisme ne se limite pas aux différences entre segments. On a pu montrer que chaque segment est lui-même composé de «compartiments», qui eux aussi diffèrent entre eux par l'état (actif ou inactif) de gènes spécifiques. C'est ainsi que les pattes et les ailes sont chacune formées de deux compartiments, antérieur et postérieur. Les limites entre ces compartiments sont parfaitement invisibles, elles ne suivent aucune marque particulière ni sur l'aile ni sur les pattes, et pourtant une cellule appartenant à un compartiment n'engendrera jamais que des cellules du même compartiment : les frontières entre compartiments, quoiqu'invisibles, sont infranchissables. Il s'agit à nouveau d'un processus de détermination, et dans ce cas également l'état de détermination est lié à l'état d'activité d'un gène spécifique : ce gène est actif dans le compartiment postérieur et non dans l'antérieur, et une mutation dans ce gène aura pour conséquence de transformer le compartiment postérieur en une réplique de l'antérieur.

Pour résumer, l'état de détermination conditionne le mode de différenciation, lors de la métamorphose ; cet état serait la résultante d'un processus combinatoire impliquant un petit nombre de gènes. Une cellule où seraient exprimés les gènes «postérieur» et «dorsal» mais aucun gène du locus *bithorax* se différenciera en cellule postérieure d'aile ; une autre où seraient actifs le gène «*bithorax*», mais non les gènes «postérieur» et «dorsal», se différenciera en cellule antérieure de troisième patte, et ainsi de suite.

4. LE CÂBLAGE DU SYSTÈME NERVEUX PÉRIPHÉRIQUE

Comme nous l'avons vu, les neurones sensoriels de la drosophile sont localisés sous l'épiderme, et leurs axones doivent rejoindre le système nerveux central, parfois fort distant, pour y établir leurs connexions. Comment y parviennent-ils ? Cette question revient à s'interroger sur l'origine des trajets nerveux périphériques (tous ceux qui sont en dehors du système nerveux central). En effet, les nerfs périphériques qui parcourent le corps et convergent vers le système nerveux central ne sont rien d'autre que des faisceaux d'axones courant parallèlement soit du centre vers les muscles (axones moteurs) soit des neurones sensoriels vers le centre (axones sensoriels). Le trajet de chaque nerf n'est nullement aléatoire : il est au contraire tout à fait reproductible d'un animal à l'autre, et chaque nerf pénètre le système nerveux central en un point qui lui aussi est constant. Ceci indique qu'il existe un mécanisme, le même pour tous les axones voyageant de conserve, les guidant avec précision tout au long de leur trajet. Quel pourrait être ce mécanisme ?

Ce problème avait été étudié chez un autre insecte (une punaise) où toutefois la situation est un peu différente. En effet, les punaises sont des insectes à métamorphose incomplète, c'est à dire que les différents stades larvaires ont déjà une forme très voisine de la forme adulte, mais sont simplement plus petits. A chaque mue, la larve grandit un peu et de nouvelles structures sensorielles viennent s'ajouter aux structures déjà présentes. Par une série d'élégantes expériences, Wigglesworth a montré en 1953 que les nouveaux axones sont dans ce cas guidés vers le système nerveux central par les axones déjà présents. Par exemple, on peut détruire les neurones sensoriels d'une petite région de l'épiderme par microcautérisation. Après la mue suivante, les nouveaux neurones qui se différencient dans cette région vont certes produire des axones, mais ceux-ci n'atteindront jamais le système nerveux central : ils forment un fouillis de fibres emmêlées, ou, souvent, un faisceau qui s'enroule sur lui-même. Ce résultat évoque exactement la mésaventure des Dupondt qui, perdus dans le désert, marchent sans arrêt jusqu'à rejoindre des traces de pas. Convaincus d'avoir trouvé une piste, ils la suivent, se réjouissant de voir les traces devenir de plus en plus nombreuses. Hélas, ils avaient tourné en rond et étaient retombés sur leurs propres traces, qu'ils suivaient inlassablement. Dans le cas des axones, ce mécanisme merveilleusement simple

et sûr est appelé «guidage par contact». Il explique tout naturellement pourquoi les axones voyagent par faisceaux et pas en ordre dispersé.

Qu'en est-il chez la drosophile ? Ici, l'épiderme de l'adulte n'est pas formé par croissance progressive d'un épiderme larvaire : il est formé «de novo», pendant la métamorphose, à partir des cellules indifférenciées des disques imaginaux. Tous les neurones sensoriels se différencient donc en même temps. Lorsque nous avons abordé cette question (en collaboration avec Ilan Deak), nous pensions que les axones sensoriels de l'adulte suivaient peut-être un ensemble d'instructions précises, dans le genre «longez l'épiderme vers l'avant, quand vous arrivez à tel muscle de vol faites-en le tour et vous arriverez au ganglion» (ce qui correspond au trajet effectivement suivi par le nerf qui réunit les axones des quelque centaines de neurones sensoriels présents dans l'aile). Pour mettre à l'épreuve cette hypothèse, nous avons fortement irradié aux rayons X des larves, ce qui provoque la mort de nombreuses cellules et par voie de conséquence d'importantes anomalies morphologiques chez l'adulte. Certains individus, quoiqu'ayant une aile bien développée, n'ont pratiquement plus d'épiderme, ou plus de muscle, ou plus aucune structure reconnaissable dans la région que traverse normalement le nerf d'aile (fig. 1, A et B). Il est évidemment impossible dans de tels individus de savoir si le trajet du nerf d'aile est normal, puisque tous les points de repère ont disparu ou sont grossièrement perturbés, mais on peut poser deux questions : les axones sensoriels de l'aile parviennent-ils au système nerveux central, et si oui, y pénètrent-ils à l'endroit normal ? Contrairement à notre attente, la réponse à la première question fut «oui» dans tous les cas. Qui plus est, dans la plupart des cas, le nerf pénètre dans le ganglion à l'endroit normal (fig. 1 C). Ceci indique que les axones ne se basent sur aucun des repères auxquels nous avons songé. Bien plus inattendu encore fut le fait que, dans certains cas, le nerf d'aile rejoint le nerf venant de l'haltère, et tous deux pénètrent conjointement dans le ganglion à l'endroit approprié pour le seul nerf d'haltère (très postérieurement par rapport à l'endroit normal pour le nerf d'aile, fig. 1 D). La manière la plus simple d'interpréter ces résultats est de reprendre l'hypothèse de guidage par contact de Wigglesworth, en ajoutant cependant l'hypothèse supplémentaire qu'un nerf larvaire relie chaque disque au système nerveux central. En effet, on peut alors détruire tous les tissus avoisinants sans affecter la capacité des axones d'aile à suivre «leur» nerf larvaire, tant que ce dernier n'a pas été atteint. Par contre, si

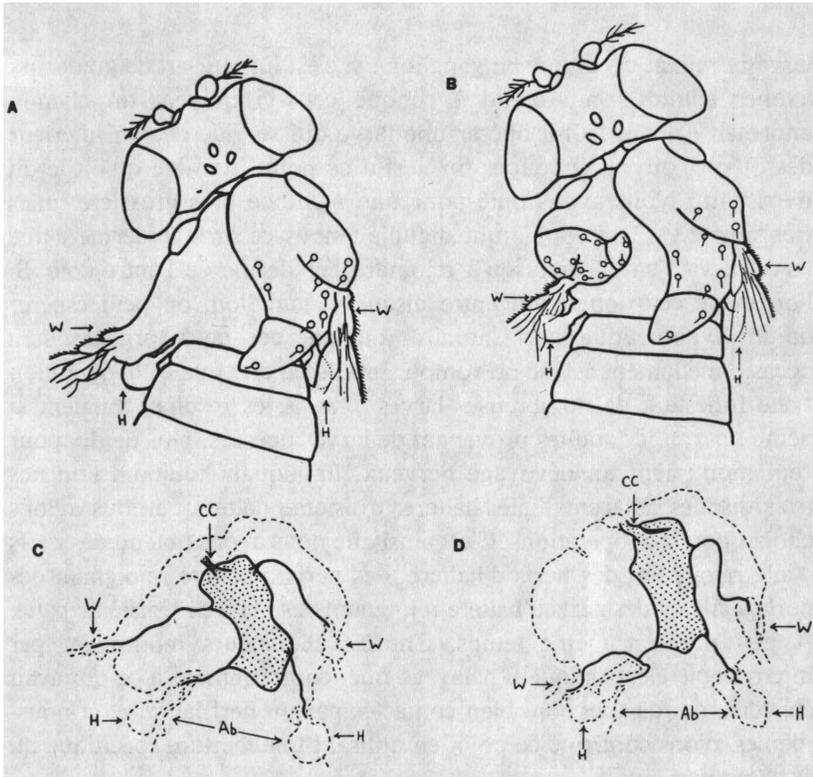


FIGURE 1.— Trajet du nerf d'aile dans des mouches contrefaites à la suite d'une irradiation aux rayons x au début de la vie larvaire. A et B représentent la morphologie externe de deux individus. C et D montrent le trajet suivi dans les deux cas par les nerfs d'aile et d'haltere. C et D ont été reconstruits à partir de sections sérielles de 4 microns teintes à l'argent. Les lignes continues représentent les nerfs, les lignes interrompues représentent le contour de l'animal, la masse pointillée est le système nerveux central (ganglion thoracico-abdominal). Abréviations : Ab, premier segment abdominal ; CC, connectif cervical reliant le ganglion au cerveau ; H, haltere ; W, aile.

la destruction due aux rayons X endommage le nerf larvaire, les axones d'aile devront se rabattre sur un guide proche. Les disques d'aile et d'haltere (et de troisième patte) étant adjacents dans la larve, le nerf larvaire qui contacte le disque d'haltere pourra servir de substitut pour les axones d'aile. Certes, cette hypothèse se heurtait à une difficulté : on pensait jusqu'alors que ces trois disques n'étaient innervés par aucun nerf larvaire ! Nous avons néanmoins voulu tester cette explication. La manière la plus simple est évidemment de rompre l'hypothétique nerf

larvaire reliant un disque au ganglion : si c'est lui qui sert de guide aux axones adultes, on s'attend à ce que ceux-ci quivent un chemin anormal. Encore faut-il opérer une larve qui se vide de son intérieur dès qu'on l'ouvre, et couper un nerf à ce point invisible qu'on le dit inexistant ! Nous avons opté pour une méthode plus grossière, mais très simple : si l'on appuie une aiguille émoussée sur l'épiderme d'une larve, il va s'enfoncer jusqu'à rejoindre l'épiderme de l'autre côté. Si l'on mène cette opération entre disque et ganglion, on peut espérer qu'un hypothétique nerf larvaire joignant ces deux organes sera occasionnellement écrasé ou rompu. Inutile de dire que cette opération a été funeste à de nombreuses larves ... mais les résultats valaient la peine : parmi les adultes provenant de larves opérées, plus de dix pour cent montraient un dévoiement nerveux, impliquant toujours l'un des trois disques adjacents (aile, haltère, troisième patte) que nous avons choisis pour ces opérations. C'est ainsi que nous avons obtenu des nerfs d'aile rejoignant des nerfs d'haltère, des nerfs d'haltère rejoignant des nerfs d'aile, et des nerfs d'haltère rejoignant des nerfs de troisième patte. A peu près en même temps, d'autres chercheurs montraient par microscopie électronique à balayage que, contrairement à ce qui avait été écrit, ces disques sont bien contactés par un nerf larvaire, et nous-mêmes avons confirmé ce point en utilisant une teinture spécifique du système nerveux.

Il ressort donc de ces expériences que l'établissement des trajets périphériques s'établit, chez un insecte à métamorphose complète également, par «guidage par contact». De plus, nos expériences montrent que ce guidage est complètement aspécifique : un nerf d'haltère (troisième segment thoracique, dorsal) rejoindra aussi bien un nerf d'aile (deuxième segment) qu'un nerf de patte (ventral). Le mécanisme est donc le plus simple qui soit : «Suivez la première fibre nerveuse que vous rencontrez, et vous arriverez à bon port».

Avant de terminer cette section, il faut répondre à deux questions soulevées indirectement par ce résultat : d'une part, à quoi est dû le trajet compliqué et louvoyant de certains nerfs, et d'autre part, comment sont établies les premières connexions (larvaires) reliant les disques au système nerveux central ? La réponse à la première question est simple : cette complexité est secondaire. Dans la larve, le nerf qui relie disque et ganglion suit un trajet à peu près droit ; au moment de la métamorphose, ce nerf sera déplacé en sens divers par le déploiement de l'épiderme adulte, poussé d'un côté ou de l'autre par le

développement des muscles de vol, qui remplissent l'essentiel de la boîte thoracique, et par la mise en place d'autres organes internes. Tous ces processus étant parfaitement reproductibles d'une mouche à l'autre, le trajet final du nerf le sera aussi, mais ce trajet tortueux est acquis passivement par le nerf. Du point de vue des axones en croissance, ce labyrinthe n'a rien de compliqué : ils n'ont qu'à suivre leur fil d'Ariane, le nerf larvaire. Ceci nous amène à la deuxième question : nous n'avons fait que reculer le problème, il faut maintenant expliquer les trajets des nerfs larvaires. Quoiqu'on ne sache pas exactement comment ces trajets sont établis, on peut proposer la description suivante, qui est certainement correcte dans ses grandes lignes.

Le système nerveux central apparaît d'abord comme un boudin segmenté s'étendant tout au long de l'embryon. Chaque segment du système nerveux correspond à un segment de l'épiderme. A ce stade, les cellules imaginaires sont déjà déterminées. Pendant plusieurs heures, les disques imaginaires qui ne comprennent encore que quelques dizaines de cellules, sont donc à proximité immédiate du segment correspondant du système nerveux. On peut imaginer que c'est pendant cette période que s'établissent les connexions nerveuses entre disques et système nerveux central : la distance à franchir est alors si petite (quelques millièmes de millimètres) que n'importe quel mécanisme d'orientation, même très imprécis, pourrait assurer l'établissement d'une liaison axonale entre disque et segment correspondant du système nerveux. Par la suite, le boudin nerveux va se condenser : les nerfs seront alors simplement étirés entre le ganglion et leur point d'attache périphérique. La larve éclôt alors, puis grandit jusqu'à devenir mille fois plus volumineuse. Durant toute cette période de croissance larvaire, les connexions disques-ganglion s'allongent et atteignent plusieurs dizaines de microns. Puis vient la métamorphose et le développement des nerfs de l'adulte, longs certains de plusieurs centaines de microns et au trajet capricieux.

Cette description concorde parfaitement avec des résultats récents obtenus par M. Bate sur un autre insecte, le criquet. Tout comme la punaise, le criquet est un insecte à métamorphose incomplète, c'est à dire que dès l'éclosion la larve ressemble déjà à un adulte en miniature. Au moment où se forme le système nerveux central de l'embryon, les appendices (pattes, antennes) commencent tout juste à se développer. A l'extrémité de chacun de ces bourgeons se différencient deux neurones « pionniers » qui envoient leurs axones vers le ganglion segmentaire

correspondant. Par la suite, ces ébauches de membres se développent, leurs extrémités s'éloignent progressivement du système nerveux central et les axones pionniers s'allongent en conséquence. Lorsque finalement les neurones sensoriels de ces appendices apparaissent, les axones pionniers sont toujours là, parcourant la patte ou l'antenne d'un bout à l'autre, pour leur servir de guides.

5. LE CÂBLAGE DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL : MÉTHODOLOGIE

Nous avons examiné dans la section précédente comment s'établissent les trajets des nerfs reliant le système nerveux central à la périphérie (nerfs moteurs et sensoriels). Il nous faut maintenant aborder le problème autrement compliqué du câblage du système nerveux central lui-même. Nous avons vu, dans l'introduction de ce chapitre, que le réseau de connexions neuronales est la base même de la fonction nerveuse, ce qui explique la quantité considérable d'efforts déployés pour comprendre comment s'établissent ces connexions. Les systèmes utilisés vont de l'infusoire au singe en passant par la sangsue, le poisson rouge, le crapaud et bien d'autres ; les méthodes relèvent de l'électrophysiologie, de l'anatomie, de la culture de cellules *in vitro*, de l'immunologie, de la cytologie ; les approches sont basées sur l'observation du système nerveux normal, sur l'étude de son développement, sur l'analyse de son comportement après des opérations chirurgicales diverses. Cette masse considérable d'observations et d'expériences, certaines admirablement conçues, n'a néanmoins pas encore permis de dégager de conclusions générales. Bien sûr, il est concevable qu'il n'y ait pas de règle générale, que différents neurones emploient des méthodes différentes pour parvenir à leurs fins. Mais d'autres raisons pourraient expliquer l'apparente hétérogénéité des données rassemblées jusqu'à présent. Ces raisons proviennent de ce que, pour comprendre les relations causales qui sous-tendent un processus, il faut perturber ce processus. En effet, aucune observation du développement normal, aussi minutieuse soit-elle, ne pourra distinguer les relations causales des simples associations : ce n'est pas parce qu'une chose se produit toujours juste avant une autre, au cours du développement normal, qu'il y a lien de cause à effet entre les deux. Il faut donc pouvoir altérer l'un ou l'autre élément du processus et observer quel effet aura cette altération. Or, en biologie, il peut y avoir

une différence considérable entre l'altération qu'on pense introduire et celle qu'on introduit effectivement. Chacun connaît la parabole de la puce : un biologiste ayant observé qu'une puce ne répond plus à l'ordre de sauter quand on lui a coupé les pattes, en conclut qu'elle entend par ces appendices. Cette parabole illustre d'ailleurs merveilleusement une autre chausse-trappe classique : celle qui consiste à confondre relation causale et relation simplement permissive (où un élément, quoique nécessaire à la suite du processus, n'en est nullement la cause). La littérature scientifique (en particulier dans le domaine de la recherche sur le cancer) est un réservoir inépuisable de ce type d'abus. Pour en revenir au premier danger, la manière classique d'amener des perturbations dans le développement des connexions neuronales est de procéder à des greffes, à des ablations, bref à des opérations chirurgicales. Or, ces opérations ont bien sûr d'autres effets que celui qu'on veut obtenir : stimulation locale de la croissance, dégénérescence et régénération plus ou moins localisées, plus ou moins prononcées selon le système utilisé. De plus, ces opérations ne peuvent avoir lieu qu'à un stade relativement tardif du développement, à un moment où le réseau de connexions est déjà largement établi. Enfin, une opération n'est jamais rigoureusement reproductible, et il est impossible d'établir si les «résultats exceptionnels» (qui, dans certaines expériences, sont fort nombreux) résultent d'opérations moins bien réussies ou font partie de l'ensemble de réponses inhérent au système. Ajoutons enfin que l'immense majorité de ces expériences porte sur de vastes ensembles de neurones dont on étudie la réponse globale sans pouvoir jamais décrire la réponse précise d'un neurone identifié, reconnaissable dans chaque animal. On devine combien l'interprétation de ces résultats est délicate.

L'utilisation des mutations homéotiques de la drosophile permet d'éviter dans une large mesure ces difficultés. En effet, ces mutations provoquent la transformation d'un segment en un autre ; certaines entraînent dès lors l'apparition d'appendices sur un segment où ils sont normalement absents, ou l'inverse. Ces mutants sont donc équivalents à des animaux où l'on aurait greffé, ou extirpé, ces appendices. Comme il n'y a pas intervention chirurgicale, on n'a pas à craindre de réponse parasite liée à l'opération elle-même. D'autre part, la transformation se manifeste tout au long du développement, et ne viendra donc pas «trop tard» par rapport aux étapes critiques du câblage du système nerveux. Enfin, le résultat ne dépend pas de l'habileté chirurgicale de l'expérimentateur : les mouches possédant une mutation donnée

montreront toutes la même transformation. Dernier point, déjà mentionné plus haut : certains neurones sensoriels des insectes sont aisément identifiables et reconnaissables d'un individu à l'autre.

Naturellement, tous ces avantages comportent leurs revers : certes, on n'occasionne pas de traumatisme chirurgical, mais le traumatisme génétique pourrait lui aussi avoir des effets secondaires inattendus. Certes, la transformation est toujours la même mais elle peut être plus ou moins complète d'un individu à l'autre. De plus, tant qu'on n'a pas parfaitement compris comment agit une mutation (et on en est encore loin, même dans le cas privilégié des mutations homéotiques) on s'expose au risque de se fourvoyer sérieusement dans l'interprétation des résultats. Enfin, il est concevable que les mécanismes assurant la connectivité soient fondamentalement différents chez les insectes et chez les vertébrés. Il est donc clair que la drosophile n'est, pas plus qu'aucun autre système, l'organisme idéal pour étudier la connectivité. Ce qui nous paraît important, c'est que les avantages et inconvénients liés à l'utilisation de mutations homéotiques sont très différents de ceux présentés par la plupart des autres approches : on peut donc espérer que se dégageront des principes qui n'étaient pas apparus jusque maintenant.

6. LE CÂBLAGE DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL : RÉSULTATS

Le principe de l'expérience est simple : prenons un mutant bithorax, où le troisième segment thoracique se développe comme s'il était deuxième segment (fig. 2A). Le disque d'haltère sera donc transformé et produira, au lieu d'une haltère, une demi-boîte thoracique et une aile. Cette boîte thoracique sera pourvue de soies, l'aile portera des structures sensorielles qui n'ont pas d'équivalent sur l'haltère. Les neurones sous-jacents enverront leurs axones le long du nerf larvaire qui contacte ce disque et pénétreront donc le ganglion très postérieurement par rapport aux axones venant de l'aile et de la boîte thoracique normales (fig. 3). Que vont faire ces axones une fois arrivés au système nerveux central : seront-ils perdus et croîtront-ils dans n'importe quelle direction ? Ou longeront-ils le ganglion jusqu'à retrouver le point d'entrée normal du nerf d'aile ? Ou se dirigeront-ils directement vers leurs cibles normales, suivant ainsi un autre chemin que celui qu'ils auraient normalement suivi ? La réponse est parfaitement claire et merveilleusement reproductible : dans tous les

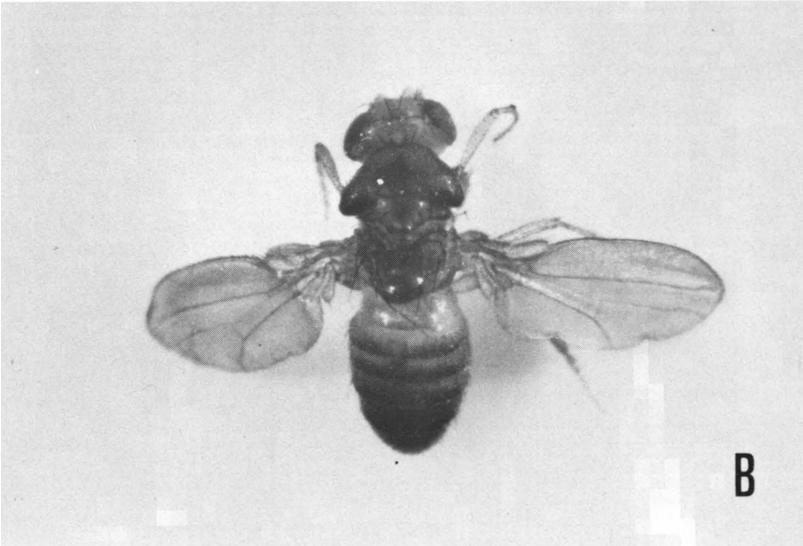
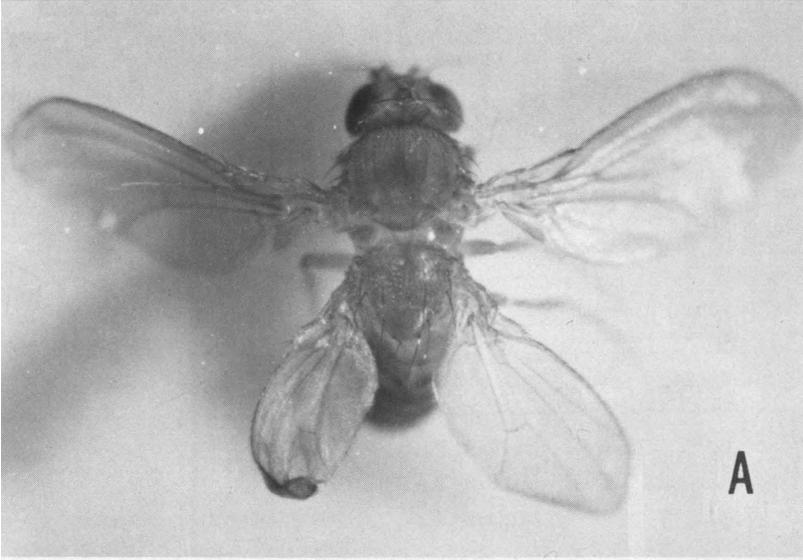


FIGURE 2.— Photographies montrant l'aspect (A) du mutant bithorax, qui transforme en deuxième le troisième segment thoracique, et (B) d'un double mutant bithorax et wingless, où les deux ailes portées par le deuxième segment thoracique sont absentes. Le mutant bithorax est en fait lui-même un double mutant *bx pbx* (voir le chapitre «La génétique de la détermination»).

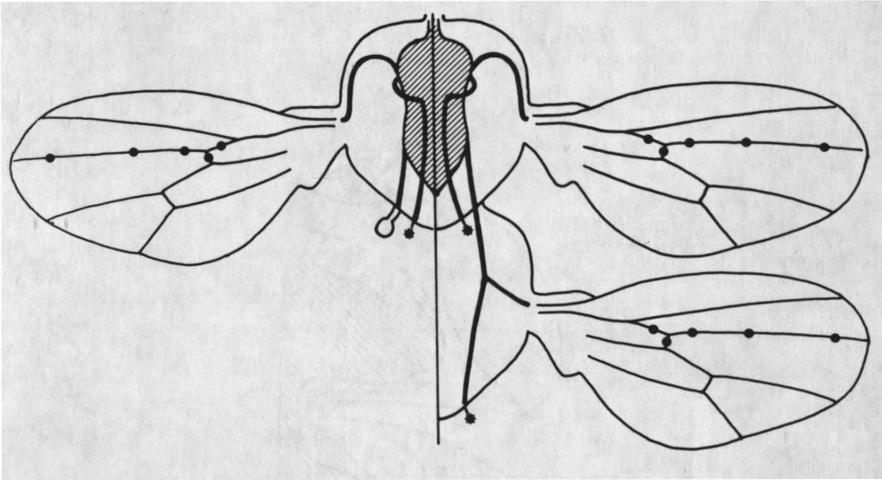


FIGURE 3.— Diagramme montrant les trajets des nerfs sensoriels thoraciques dans un individu normal (moitié gauche du diagramme) et dans un mutant bithorax (moitié droite). Symboles : traits fins, contour du thorax ; traits gras, nerfs ; région hachurée, ganglion thoraco-abdominal ; astérisques : soies postérieures du thorax (voir figs. 4 et 5) ; ronds noirs, sensilles campaniformes de l'aile (voir fig. 6).

cas, ces axones suivent avec perfection et minutie un trajet identique à celui qu'empruntent les axones homologues venus du deuxième segment thoracique (normal). Prenons le cas des soies situées à l'arrière de la boîte thoracique (fig. 4). Le trajet des axones normaux au sein du système nerveux central est représenté fig. 4 et 5A. Les axones venant du thorax homéotique entrent à un autre endroit, pénètrent dans le ganglion, tombent sur leur chemin prospectif et dès lors le suivent dans son entièreté (fig. 5B). Le résultat est exactement le même dans le cas d'un autre type de structures sensorielles, les sensilles campaniformes, présentes sur l'aile mais pas sur l'haltère. On peut même s'amuser à examiner quelques unes de ces sensilles sur l'aile normale droite, et sur l'aile homéotique gauche, de la même mouche : on voit alors la quasi parfaite symétrie des trajets (fig. 6).

La conclusion saute aux yeux : ces axones reconnaissent dans le ganglion un chemin préexistant. Dès qu'ils atteignent ce chemin, ils le suivent tout au long, si bien que leur trajet final sera le même quel que soit l'endroit où ils rencontrent ce chemin préexistant. On peut cependant imaginer une autre interprétation. Selon celle-ci, les axones

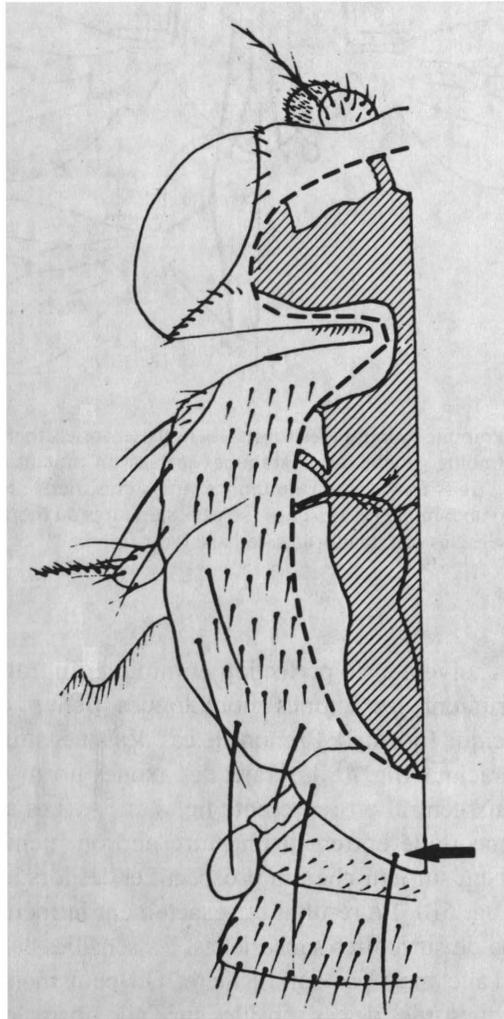


FIGURE 4.— Thorax et tête d'une drosophile normale, partiellement ouverte pour montrer la position du système nerveux central (cerveau et ganglion thoracico-abdominal, hachurés). Le neurone de la soie indiquée par une flèche a été marqué ; on voit le trajet de son axone dans le ganglion (ligne noire).

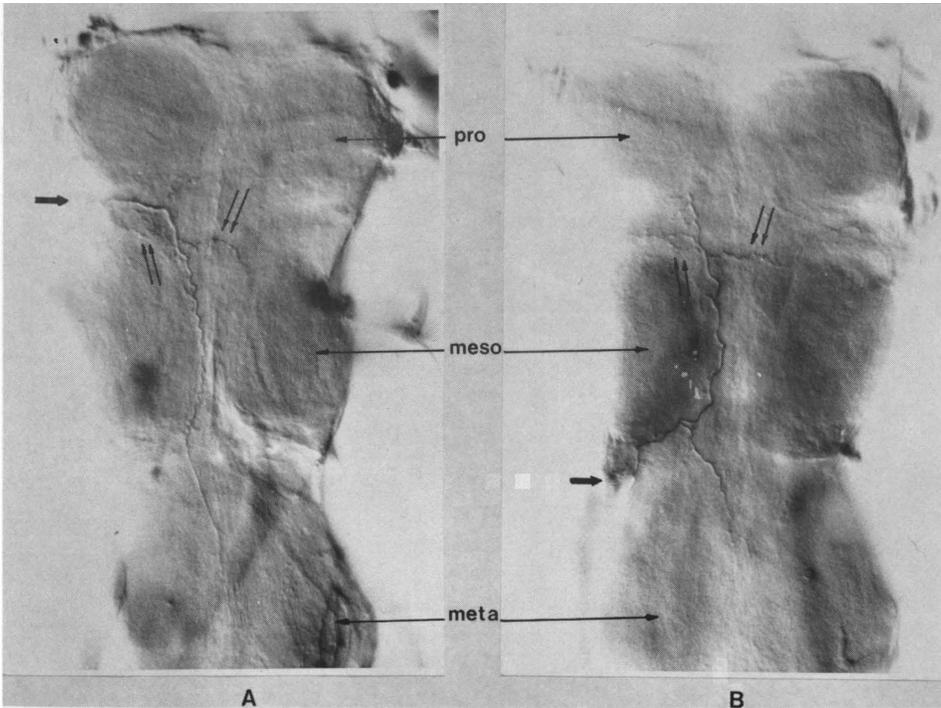


FIGURE 5.— Photographie de l'axone dessiné dans la fig. 4. Cet axone a été marqué en arrachant la soie fléchée sur cette même fig. 4. En A, on a arraché la soie présente sur la boîte thoracique d'un individu normal, cf fig. 3 à gauche. Le résultat est le même dans le cas de la soie présente sur la boîte thoracique antérieure (normale) d'un mutant bithorax. En B, on a arraché la soie présente sur la boîte thoracique postérieure (homéotique) d'un mutant bithorax, cf. fig. 3 à droite. Abréviations : meso, meta, pro : centres d'association des deuxième pattes (lésothoraciques), troisième pattes (métathoraciques), et premières pattes (prothoraciques). Symboles : les flèches grasses indiquent l'endroit où l'axone entre dans le ganglion, qui apparaît sur la photo comme une masse grise ; les doubles flèches attirent l'attention sur des ramifications de l'axone.

homéotiques reconnaissent et suivent, non pas un chemin préexistant, mais bien les axones homologues venant de l'aile normale, lesquels établiraient leur propre trajet selon des règles inconnues. Cette interprétation alternative est facile à tester : il suffit d'éliminer les axones normaux, et de voir si ceci rendra les axones homéotiques incapables d'établir un trajet normal. Cette expérience pourrait être réalisée en extirpant le disque aile-thorax normal. Un moyen beaucoup plus simple est d'utiliser une autre mutation, *wingless*, qui supprime les appendices dorsaux, et par conséquent les axones qui en seraient normalement issus. Cette mutation a l'intéressante particularité que chaque appendice a à peu près une chance sur deux de se développer normalement, et l'autre de ne pas se développer du tout. Si l'on combine cette mutation avec la mutation *bithorax*, on obtiendra donc des mouches qui auront deux, une ou aucune aile normale et deux, une ou aucune aile homéotique. En particulier, on aura des individus où les ailes homéotiques seront présentes et les ailes normales, absentes (fig. 2B). Si l'on examine les axones homéotiques d'une telle mouche, on s'aperçoit que l'absence d'ailes normales (et donc l'absence d'axones normaux venant de ces ailes) n'affecte en rien le trajet qu'ils suivent au sein du système nerveux central (fig. 7). Ceci montre que le chemin que reconnaissent et suivent les axones homéotiques n'est pas tracé par les axones normaux : ce chemin préexistait dans le ganglion, et sert de guide tant aux axones normaux qu'aux axones homéotiques.

Ce résultat entraîne un retournement de la perspective : alors qu'on considère habituellement que l'important, c'est la cible, et que le trajet n'est rien plus que ce qui relie le point de départ au point d'arrivée de l'axone, il apparaît au contraire que le trajet est essentiel au point d'être rigoureusement déterminé. Le trajet, au lieu d'être un aspect secondaire, devient ainsi un aspect essentiel de la connectivité : c'est parcequ'il reconnaît et suit le chemin approprié que l'axone arrive à proximité de sa cible (nous verrons plus loin comment on pourrait tester cette interprétation). Il faut alors imaginer que le système nerveux central est parcouru d'un réseau de chemins, chacun marqué spécifiquement comme nos sentiers de randonnée. Tout axone pourra alors reconnaître le chemin qui lui convient et, le suivant, arriver à sa destination. Se pose alors la question de savoir comment le randonneur choisit le sentier qu'il va suivre, ou pour revenir au système nerveux, comment l'axone sait quel chemin il doit reconnaître et suivre : cette question sera examinée dans la section suivante. Avant cela, il nous

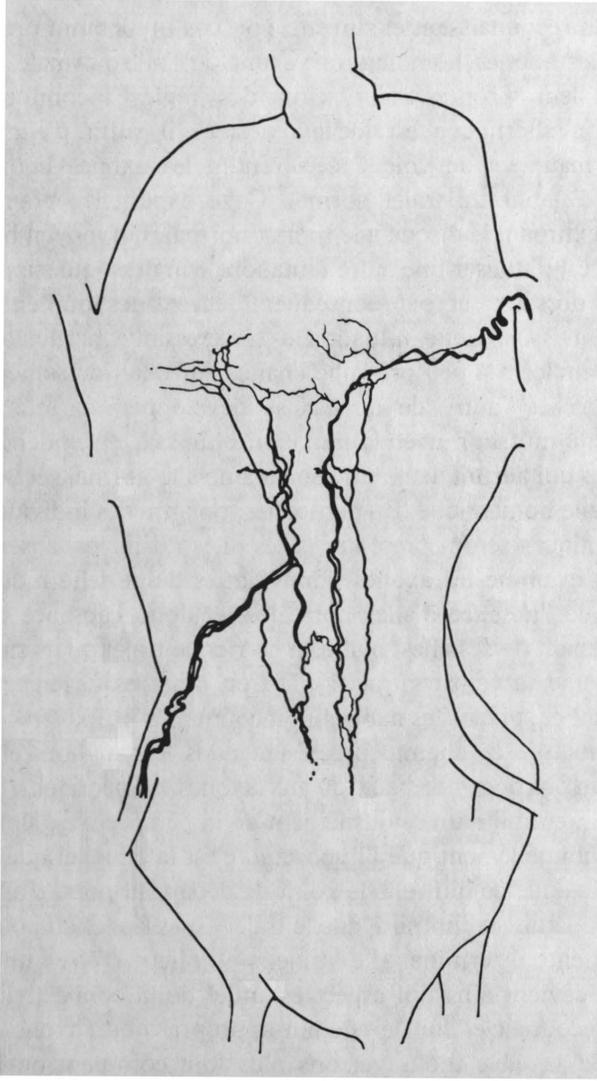


FIGURE 6.— Trajets suivis dans le ganglion par les axones des neurones innervant les sensilles campaniformes de l'aile. Dans ce cas, on a marqué à droite des sensilles de l'aile droite antérieure (normale), et de l'aile gauche postérieure (homéotique) d'un même mutant bithorax. Les quatre photographies représentent des plans de plus en plus ventraux du même ganglion : les axones suivant un trajet sinueux, il n'est pas possible de les suivre en entier sur une seule photographie. Les flèches grasses indiquent les points d'entrée, dans le ganglion, des axones venant de l'aile normale (en B) et de l'aile homéotique (en D). Les doubles flèches attirent l'attention sur des détails et des branches qui se retrouvent symétriquement dans la projection normale, à droite, et dans la projection homéotique, à gauche.

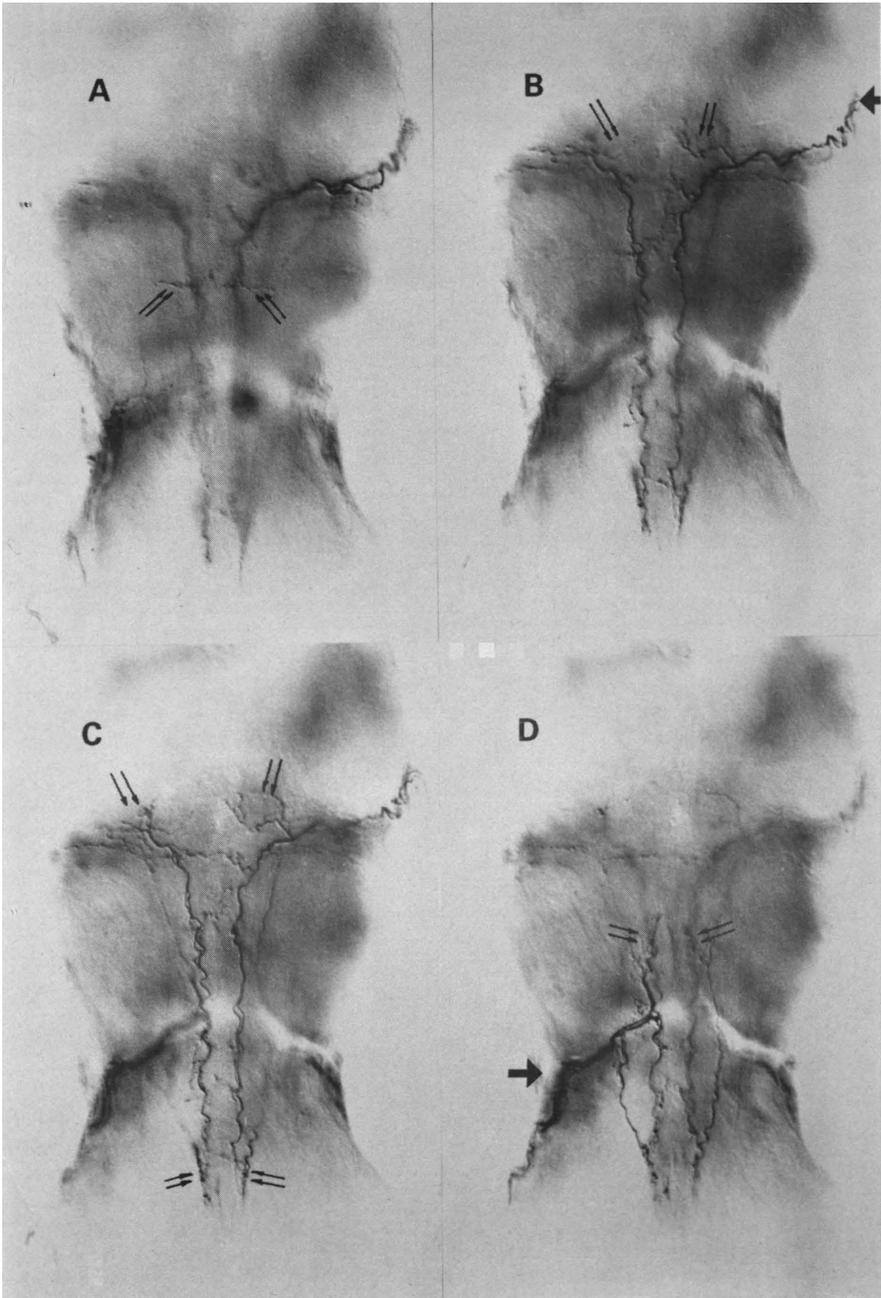


FIGURE 6.

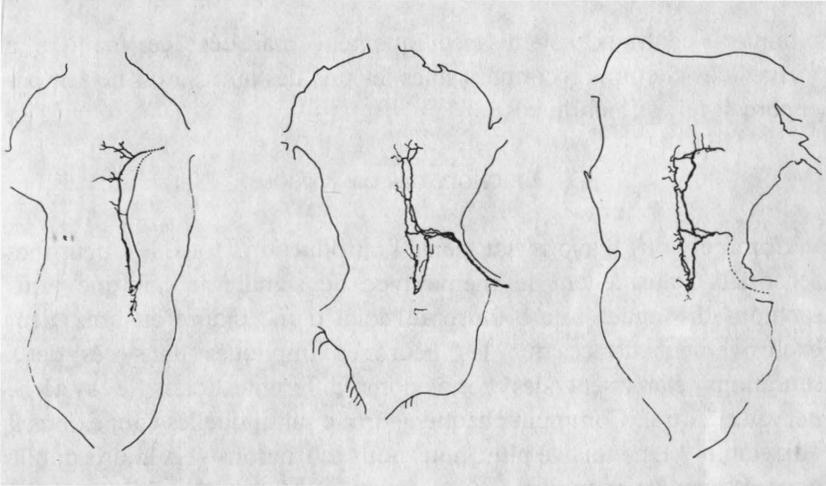


FIGURE 7.— Trajets suivis dans le ganglion par les neurones innervant les sensilles campaniformes de l'aile dans un double mutant *bithorax* et *wingless*. A : sensille de l'aile droite antérieure (normale), B : sensilles de l'aile droite postérieure (homéotique) dans un individu où l'aile antérieure (normale) est présente, cf fig. 2A ; C : sensilles de l'aile droite postérieure (homéotique) dans un individu où l'aile antérieure (normale) est absente, cf fig. 2B. Des différences de détail peuvent être notées d'une préparation à l'autre, mais dans tous les cas la forme générale et l'emplacement des trajets au sein du ganglion sont constants.

faut encore examiner un point important : quelle peut être l'origine de ce réseau de chemins qui jalonnent le système nerveux central ?

Comme dans le cas du système nerveux périphérique, il semble probable que ce réseau apparaisse très tôt pendant la neurogénèse, à un stade où les distances à franchir sont courtes et où il est donc relativement aisé d'établir un jeu simple de connexions longitudinales et transversales. A nouveau, le développement progressif du système nerveux fera que ces connexions initialement courtes et simples s'allongeront et se déformeront, pour aboutir finalement aux chemins longs et complexes dont on observe la trace chez l'adulte. Très récemment, M. Bate, C. Goodman et D. Bentley ont montré chez le criquet que les toute premières fibres qui se développent dans le système nerveux central établissent en effet un réseau très simple, en forme d'échelle à double barreaux, qui pourrait bien jouer dans le système nerveux central un rôle analogue à celui des axones « pionniers » à la périphérie. Il faudrait pour cela que ces neurones

pionniers centraux soient spécifiquement marqués, de manière à former des chemins reconnaissables les uns des autres : on ne sait pas encore si tel est bien le cas.

7. LE CHOIX DES CONNEXIONS

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, tous les neurones sensoriels transmettent le même type de signal : le fait que nous sachions distinguer une brûlure au doigt d'une piqûre au bras vient exclusivement de ce que les neurones impliqués dans ces deux sensations établissent des connexions différentes dans le système nerveux central. Comment chaque neurone sait-il quelles connexions il doit établir ? Une fois de plus, nous nous tournerons vers la drosophile pour essayer de répondre à cette question. Mais d'abord, la mouche est-elle capable de distinguer différentes stimulations ? Pour le savoir, il suffit de l'observer avec sympathie : tout un chacun qui s'est livré à cette occupation sait qu'une mouche passe une partie importante de son temps à se nettoyer. Elle se frotte les pattes antérieures l'une contre l'autre, elle lisse ses ailes de ses pattes postérieures, elle se brosse la tête et les antennes, bref, elle se bichonne sans arrêt. Il pourrait bien s'agir d'actes automatiques, sans grand intérêt pour nous (quoique de tels comportements ne soient pas sans exemples dans l'espèce humaine). Il se pourrait aussi que ces actes soient des réponses aux informations venant des multiples soies sensorielles qui la recouvrent. En bref, les mouches se nettoient-elles par compulsion, ou bien se grattent-elles parce que ça les chatouille ? Pour le savoir, il suffit de les chatouiller et de voir si elles répondent. Une telle opération est, on l'aura deviné, horriblement compliquée à mener sur une mouche intacte. En revanche, elle devient très simple sur une mouche décapitée. Une telle mouche survit pendant des heures ; privée d'encéphale, elle est néanmoins capable de se tenir debout, de se remettre sur ses pattes si on la retourne, d'avancer de quelques pas si on la pousse, mais elle reste parfaitement immobile tant qu'on la laisse tranquille et n'a plus l'idée de s'envoler dès qu'on l'effleure. A l'aide d'un fin poil de pinceau, ou d'un cil, on peut alors titiller l'une ou l'autre soie : la mouche répond aussitôt en frottant vigoureusement l'endroit stimulé. Il est donc clair que, non seulement les mouches se frottent quand on les chatouille, mais mieux encore : là où on les chatouille. Il semble donc que différents neurones de soies soient

programmés pour établir différentes connexions. S'agit-il réellement d'une programmation innée, ou bien les mouches apprennent-elles la bonne réponse par tâtonnements ? Les chercheurs versés en psychologie expérimentale ont mis au point de nombreux protocoles pour répondre à cette question ; dans notre cas, nous avons opté pour une méthode simple : utiliser une mutation qui change certaines soies de place. Si l'on stimule les soies antérieures de la boîte thoracique, la première patte vient frotter cette région. Il existe une mutation qui remplace l'aile par une boîte thoracique surnuméraire, plus petite que le thorax normal mais néanmoins parfaitement reconnaissable. De par sa position, cette boîte thoracique est tout à fait hors de portée de la première patte. Néanmoins, si l'on stimule les soies antérieures de ce thorax supplémentaire, on observe une réaction vive de la première patte dirigée vers la partie antérieure du thorax normal : manifestement, cette réponse ne résulte pas d'un apprentissage. Les neurones de soies antérieures du thorax sont programmés pour établir un certain type de connexions, et ils le feront, que la réponse résultante soit efficace ou non.

Nous pouvons maintenant poser la question qui nous intéresse : de quoi dépend le choix des connexions qu'établit un neurone sensoriel ? Nous avons abordé cette question dans le cas des soies des pattes, qui offrent un répertoire de réponses plus riche que les soies du thorax. En effet, si l'on stimule des soies antérieures de la première patte on observe que cette patte se frotte contre l'autre première patte ; si l'on stimule des soies postérieures de cette même patte, c'est la deuxième patte du même côté qui viendra frotter la première ; la stimulation de n'importe quelle soie de la deuxième patte entraîne simplement un retrait de celle-ci ; quant à la troisième patte, son comportement est en quelque sorte symétrique de celui de la première : si l'on stimule les soies antérieures, c'est la deuxième qui viendra la frotter, si l'on effleure les soies postérieures, c'est au contraire la troisième patte du côté opposé qui se met en branle. Une première conclusion s'impose : le type de connexion semble dépendre du segment auquel appartient le neurone. Mais dans chaque segment, on observe encore une différence entre soies antérieures et soies postérieures. Rappelons ici que toutes les pattes sont divisées en deux compartiments, l'un postérieur, où le gène de contrôle correspondant est actif, et l'autre antérieur, où ce gène est inactif. Se pourrait-il que l'appartenance à un compartiment coïncide avec un certain type de connexion ? Pour le savoir, nous avons stimulé

une série de soies situées juste de part et d'autre de la limite compartimentale (fig. 8). Il apparaît que les deux propriétés coïncident exactement, ce qui suggère (mais bien sûr ne prouve pas) que le type de connexion neuronale dépend lui aussi de l'état d'expression de ce même gène.

Nous en arrivons ainsi à une explication simple pour le choix des connexions sensorielles. Dans chaque neurone sensoriel, tout comme dans les cellules épidermiques qui les entourent, certains gènes de contrôle sont exprimés et d'autres pas. Une combinaison donnée de gènes exprimés correspond à un état de détermination particulier, ce qu'on peut appeler l'identité segmentaire et compartimentale de ce neurone. C'est cet état de détermination qui impose le type de connexions que ce neurone établira. Un neurone sensoriel n'a donc pas à choisir ses connexions, pas plus qu'une cellule épidermique n'a à choisir quel type de structure elle va former.

Mentionnons, pour terminer, que le type de connexions qu'un neurone établira dépend aussi du type de structure sensorielle dont ce neurone fait partie (un neurone de soie et un neurone de sensille campaniforme établiront des connexions différentes, même s'ils sont situés dans le même compartiment), et également dans certains cas de la position du neurone au sein du compartiment. Nous avons insisté ici sur l'importance de l'identité compartimentale et segmentaire parce que ce facteur, qui paraît d'une importance considérable dans le cas de la drosophile, n'avait pas été mis en évidence jusqu'à présent.

8. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Quoi de plus futile qu'arracher les poils d'une mouche, ou en chatouiller une autre ? Et pourtant, nous l'avons vu, de tels jeux – on hésite à parler d'expériences – nous ont permis de débroussailler un problème au premier abord décourageant de complexité. Le physicien Max Delbrück a merveilleusement ironisé sur un des pièges de la recherche en biologie, en disant qu'il n'est aucun problème, si compliqué soit-il, qu'une étude soigneuse et approfondie ne rende plus compliqué encore. Au risque de tomber dans le piège inverse d'une simplification exagérée, résumons notre vision actuelle du développement d'un neurone sensoriel.

Lorsqu'un neurone sensoriel adulte se différencie, il possède en lui un jeu d'informations précisant son identité segmentaire et comparti-

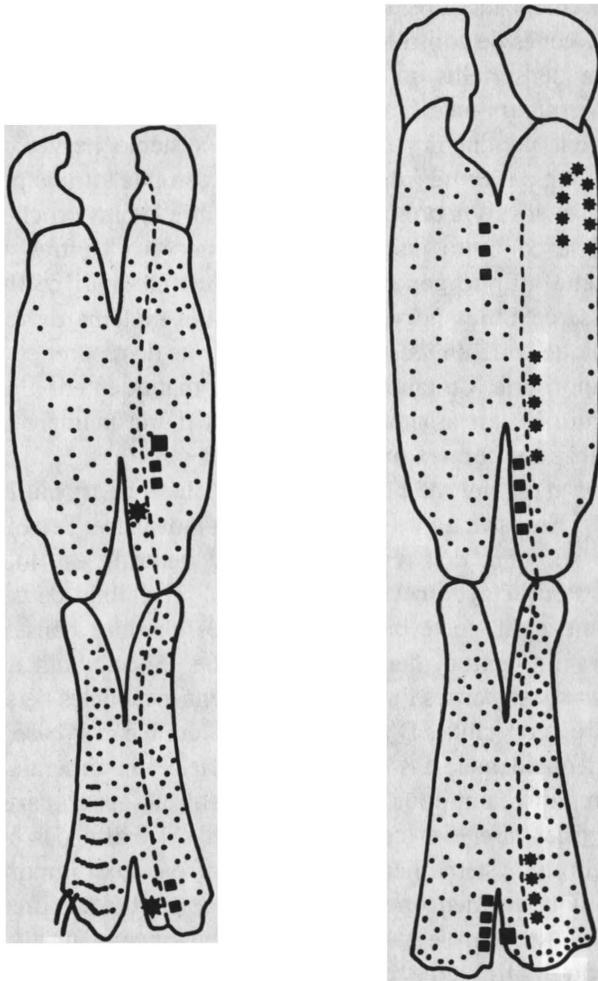


FIGURE 8.- Réponses observées lors de la stimulation de soies individuelles ou de rangées de soies situées sur la première patte (patte prothoracique, dessin de gauche) et sur la troisième patte (patte métathoracique, dessin de droite). Chaque soie est représentée par un point. Les soies dont la stimulation entraîne un mouvement de nettoyage par la patte homologue sont représentées par un astérisque, celles qui induisent un mouvement de nettoyage par la deuxième patte (mésothoracique) sont représentées par un carré. Les tirets indiquent la limite entre les compartiments antérieur et postérieur de la patte.

mentale. Ces informations, héritées de cellules en cellule tout au long du développement larvaire, sont représentées par l'état d'activité d'un ensemble de gènes de contrôle. En fonction de cette identité, et du type de structure sensorielle qu'il innerve, le neurone exprime un ou plusieurs marqueurs membranaires qui lui permettront de reconnaître spécifiquement un chemin donné dans le système nerveux central. L'axone produit par ce neurone possède une certaine affinité pour toute fibre nerveuse ; il suivra donc, au départ, la fibre la plus proche : le nerf larvaire qui le conduira jusqu'au système nerveux central. Une fois arrivé là, cette affinité générale ne joue plus, car tout ce tissu n'est qu'une masse de fibres nerveuses. Dès lors, le système de reconnaissance spécifique entre en jeu, et permet à l'axone de repérer et de suivre le chemin approprié. Ce faisant, il passe automatiquement à proximité de la cible qui lui est assignée, la reconnaît d'une manière ou d'une autre, et établit ses connexions.

Ce schéma n'est rien de plus qu'une hypothèse de travail basée sur nos résultats. En particulier, sa partie la plus novatrice, l'établissement des trajets au sein du système nerveux central, est loin d'être démontrée. Pour étayer cet édifice, il faudrait établir deux points : premièrement, qu'il existe bien un réseau de chemins balisés dans le système nerveux central, deuxièmement, que si l'on abolit un de ces chemins les axones censés l'utiliser deviennent incapables de s'orienter et d'atteindre leur cible. D'autre part, cet édifice est basé sur des résultats obtenus dans le cas d'axones sensoriels : on aimerait savoir si les mêmes règles valent pour les neurones centraux, et en particulier si l'identité segmentaire – et compartimentale, s'il existe des compartiments au sein du système nerveux – joue un rôle aussi important à ce niveau que pour les neurones sensoriels. Ce serait là un premier pas dans l'étude du contrôle génétique du développement du système nerveux central, problème dont nous ne savons encore rien. Cette dernière question implique une compréhension en profondeur du système qui est responsable de l'acquisition de l'identité segmentaire, et de la détermination en général : nous renvoyons le lecteur au chapitre «La génétique de la détermination» pour un traitement plus complet de ce point, et de l'approche que nous comptons utiliser. Nous allons esquisser ici, pour terminer ce chapitre, les voies que nous pensons suivre pour aborder les deux premières questions.

Première question : le système nerveux central est-il quadrillé de chemins reconnaissables les uns des autres ? On sait que n'importe

quelle molécule un peu volumineuse induit, lorsqu'elle est injectée à un mammifère, une réponse immunitaire. Il y a alors production d'anticorps dirigés spécifiquement contre cette molécule, c'est à dire capables de la reconnaître spécifiquement et de s'y fixer. On peut purifier ces anticorps, et les coupler à une molécule fluorescente. Si l'on fait réagir ces anticorps couplés avec des tranches d'un tissu possédant la molécule de départ, toutes les régions où cette molécule est présente fixeront l'anticorps et deviendront donc fluorescentes, ce qu'on pourra facilement observer au microscope. (En fait, on emploie une technique encore plus simple mais un peu plus longue à expliquer). Si donc il existe réellement des chemins balisés au sein du système nerveux central, on devrait pouvoir obtenir des anticorps contre ces balises : chaque anticorps spécifique d'une balise devrait alors révéler, en s'y fixant, l'entièreté du chemin correspondant. Une technique récente permet d'immortaliser les cellules productrices d'anticorps. Chacune de ces cellules ne produit qu'un seul type d'anticorps, et engendre par divisions successives une population dont toutes les cellules produiront toujours ce même anticorps. En étudiant un grand nombre de ces populations, et avec de la chance, on peut en trouver certaines qui produisent des anticorps spécifiques de tel ou tel type de neurone, et peut être aussi – c'est notre espoir – certaines qui produiront des anticorps spécifiques de tel ou tel chemin. Des résultats préliminaires obtenus en étudiant des anticorps dirigés contre le système nerveux de la sangsue sont encourageants en ce qu'une proportion élevée de ces anticorps reconnaît spécifiquement certains neurones, toujours les mêmes pour un anticorps mais différents d'un anticorps à l'autre. Il y a donc incontestablement des marqueurs qui distinguent certains neurones des autres ; reste à voir si de telles différences sont utilisées pour la reconnaissance des chemins.

Deuxième question : ces chemins sont-ils nécessaires aux axones pour parvenir à leur cible ? Pour y répondre, il faut pouvoir abolir l'un ou l'autre de ces chemins. La manière pour nous la plus raisonnable d'y parvenir est d'obtenir des mutations qui empêchent ces chemins de se former, ou les empêchent d'être reconnus. Il y a tout à parier que de telles mutations seront létales (entraîneront la mort de l'individu) : en effet, chaque chemin est suivi par un grand nombre d'axones, en plus des axones sensoriels, et la suppression d'un de ces faisceaux de fibres aurait sans doute des effets graves sur le fonctionnement de l'ensemble. Par contre, si dans un animal la mutation pouvait ne se manifester que

dans un petit nombre de neurones non essentiels, des neurones sensoriels de l'aile par exemple, seuls ces neurones seraient incapables de reconnaître leur chemin : cet animal vivrait, et serait simplement dépourvu d'informations sensorielles en provenance de cette aile. Or, dans le cas de mutations affectant un des quatre chromosomes de la drosophile, il est facile de générer des mouches «mosaïques», où la mutation ne se manifeste que dans une petite partie du corps, différente d'une mouche à l'autre. L'expérience consiste donc à isoler un grand nombre de mutations létales sur ce chromosome, et à voir parmi elles celles qui sont viables dans des mosaïques, lorsqu'elles ne se manifestent que dans l'une ou l'autre partie du corps. Il faut alors tester les neurones sensoriels de la région où la mutation se manifeste, soit en les stimulant, soit en examinant leurs trajets, afin de voir si certaines de ces mutations perturbent les connexions ou le trajet de ces neurones.

Un point commun à ces deux approches, d'ailleurs complémentaires, est qu'elles constituent des points de départ plus que des points d'arrivée : en effet, l'obtention d'anticorps spécifiques, ou de mutations affectant la connectivité, ouvrirait la porte à une analyse véritablement causale du développement du système nerveux.

REMERCIÉMENTS

A. G. remercie S. Benzer, A. Garcia-Bellido et M. Bate pour avoir grandement aidé à sa conversion vers un domaine auquel il était totalement étranger il y a quelques années, et R. Thomas pour son appui constant. A. G. est «chercheur qualifié» au FNRS, P.V., E. T. et R. J. sont ou ont été boursiers IRSIA.

RÉFÉRENCES

- GAZE, R. M.— «The formation of nerve connections», Academic Press, 1970.
WIGGLESWORTH, V. B.— «The principles of insect physiology», Chapman and Hall, 7th edition, 1972.
DETHIER, V. G.— «To know a fly», Holden-Day, 1962.
-

René Thomas

Titre XV

Du virus au mammifère : la logique de la régulation

... tous les chats sont mortels. Socrate est mortel. Donc Socrate est un chat.

– Et il a quatre pattes. C'est vrai, j'ai un chat qui s'appelle Socrate.

– Vous voyez ...

Ionesco
(Rhinocéros)

CHAPITRE I

INTRODUCTION : DE L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES BACTÉRIOPHAGES LAMBDÔIDES À L'ANALYSE THÉORIQUE DE LA RÉGULATION

Section 1. – *Les bactériophages lambdaïdes*

Le but, peut-être trop ambitieux, de ce chapitre, est de tenter de montrer comment l'étude expérimentale approfondie d'un virus (le bactériophage lambda) a conduit à développer une méthode d'analyse et de synthèse logique, et comment l'application de cette méthode a permis à son tour de dégager certains principes généraux concernant la relation entre la structure logique des systèmes et la gamme de leurs comportements possibles. On trouvera au début du titre IV des notions générales sur les virus et, en particulier, les bactériophages lambdaïdes. Certains aspects sont repris ici, dans une autre optique cependant ; le lecteur voudra bien excuser d'éventuelles redondances.

Les bactériophages lambdaïdes sont des virus *tempérés*. Comme les virus classiques, les virus tempérés peuvent tuer les cellules qu'ils infectent, avec libération de nombreuses particules virales ; mais leur originalité est qu'ils peuvent aussi former avec la cellule infectée une association stable de caractère symbiotique. *Dans cet état, le DNA du virus est généralement intégré dans la continuité du DNA de l'hôte et fait*

dès lors partie intégrante du patrimoine héréditaire de la bactérie. Sous cette forme intégrée, le DNA du virus est qualifié de *prophage* ; la bactérie qui héberge un prophage est qualifiée de *lysogène*. Une telle association ne peut persister que si l'expression des gènes responsables des propriétés létales du virus est empêchée ; effectivement, l'un des gènes du prophage produit un *répresseur* (voir Titre IV, section I,4) dont la présence inhibe l'expression des autres gènes viraux. En fait, cette inhibition porte non seulement sur les gènes du prophage lui-même, mais aussi sur ceux de tout virus de même type qui viendrait à infecter la bactérie lysogène. Il en résulte que cette bactérie est *immune* vis-à-vis de l'infection par le type de virus dont elle héberge un exemplaire à l'état de prophage. Il existe de nombreux types de bactériophages tempérés, caractérisés chacun par la spécificité de leur immunité.

Section 2.— *Un choix entre deux destins*

Les bactériophages tempérés sont parmi les objets vivants qui ont apporté le plus d'idées en biologie moléculaire. Mais leur aspect le plus fascinant est sans conteste *la possibilité pour un matériel génétique somme toute relativement simple de pouvoir déboucher, dans des conditions apparemment identiques, sur deux destinées radicalement différentes* : celle d'un virus infectieux et celle d'un commensal intégré au patrimoine génétique de la bactérie. Il s'agit bien là d'une forme élémentaire de *différenciation*, dans la mesure où un même génome peut se comporter de deux manières radicalement différentes dans des conditions apparemment semblables. Mais alors qu'en aucun cas un phénomène de différenciation d'organisme supérieur n'est compris dans le détail, on en sait long sur les mécanismes de contrôle qui président au choix entre la lyse et la lysogénisation par le bactériophage λ . C'est au groupe de Jacob (EISEN *et al.*, 1970), et aussi à Neubauer et Calef (1970), que l'on doit la première percée dans ce domaine.

Section 3.— *Circuits complexes ; boucles de rétroaction (feedback)*

Depuis, la multiplicité des interactions mises en évidence a rendu la situation suffisamment complexe pour faire dire à Francis Crick que la maladie à la mode en biologie moléculaire est le «mal de tête de λ » (λ headache). Une caractéristique des schémas auxquels mène l'expé-

rience est la multiplicité des *boucles de rétroaction*. On parle de boucles de rétroaction lorsque des éléments d'un système sont fonctionnellement liés de manière cyclique ; il en est ainsi, par exemple, si le produit α influence le taux de synthèse du produit β , qui influence le taux de synthèse du produit γ , qui à son tour influence le taux de synthèse de α . Lorsqu'un système comporte plus d'une boucle de rétroaction, la logique non formalisée «de tous les jours» n'est pas d'une grande aide pour démêler l'écheveau. C'est pourquoi j'ai *du* élaborer une méthode logique applicable à ce genre de système. Je voudrais remercier ici mon collègue J. Florine et son collaborateur P. Van Ham pour leur aide inestimable.

CHAPITRE II

INTERMÈDE LOGIQUE

Il suffit de s'être trouvé confronté avec un système comportant des boucles de rétroaction pour se rendre compte que son comportement dynamique ne ressort pas de manière immédiate de sa structure. Le fonctionnement de ce type de systèmes se révèle même, bien souvent, résolument anti-intuitif, et la question se pose donc : comment raisonner sainement dans ces cas ? Le terme «raisonnement» peut être pris dans un sens tout à fait général, qui inclut un traitement mathématique quantitatif, ou dans un sens plus restrictif, qui se limite à un traitement «logique».

La description «logique» se caractérise par le fait que les variables ne peuvent prendre qu'un nombre limité de valeurs, typiquement deux seulement : 1 et 0 (qui peuvent signifier oui/non, présent/absent, vrai/faux, etc ...). Le côté caricatural de ce type de description est très visible, et frappe plus à première vue que celui des descriptions continues ; cependant, l'usage montre que celles-ci ne sont pas toujours plus réalistes. En fait, une différence est que personne ne songerait à prendre *à la lettre* la description logique, précisément parce qu'elle comporte un aspect caricatural. On pourrait, par contre, être tenté de prendre à la lettre une description continue, dont le caractère caricatural est moins flagrant ; cela peut être une erreur dans la mesure où la précision affichée par la description continue est souvent illusoire, et dépend de l'invention pure et simple de la forme exacte des interactions et des valeurs des paramètres.

Nous utiliserons ici trois opérations logiques, d'ailleurs classiques :

– *le produit logique* (ET). Si la condition F pour qu'une lampe soit allumée est que les interrupteurs a ET b soient tous deux «on», on écrit $F = ab$, qui se lit et «se pense» : « $F = a$ ET b ». De même, si la condition F pour qu'un gène soit exprimé est que les produits a ET b soient présents, on écrit $F = ab$. Plus généralement, la fonction logique F a la valeur 1 si, et seulement si, a ET b ont *tous deux* la valeur 1.

– *la somme logique* (OU inclusif). Si la condition F pour qu'une lampe soit allumée est que *l'un au moins* des interrupteurs a, b, soit «on», on écrit $F = a + b$ (et on lit et pense : « $F = a$ OU b », OU étant pris dans son sens inclusif). Si la condition F pour qu'un gène soit exprimé est que l'un au moins des produits a, b, soit présent, on écrit $F = a + b$. Plus généralement, F prend la valeur 1 si et seulement si l'une au moins des variables a, b, a la valeur 1.

– enfin, le *complément* : si la condition F pour qu'une lampe soit allumée est que l'interrupteur a soit en position «off» et *vice versa*, on écrit $F = \bar{a}$ (et on lit : « $F =$ non a»). Le complément d'une variable prend la valeur 1 quand la variable a la valeur 0, et *vice versa*.

Ainsi, lorsque nous écrivons : $a = \beta \cdot \bar{\gamma}$, cela signifie que la condition pour que a prenne la valeur 1 est «(NON β) ET (NON γ)», en d'autres termes «NI β NI γ » : il faut donc (et il suffit) que β et γ aient tous deux la valeur 0.

Ce qui précède est tout à fait classique. La difficulté était d'introduire le *temps* dans le langage logique sous une forme qui convienne aux problèmes auxquels nous étions confrontés. La méthode que nous avons élaborée sera décrite dans la section 5. Mais avant cela il nous faut parler de manière plus détaillée des boucles de rétroaction.

Section 1.– *Boucles négatives, boucles positives*

Dans une boucle de rétroaction *simple* (c'est-à-dire, non ramifiée) telle que celle qui a été décrite plus haut (ce chapitre, section I, 3), chaque élément est activé ou inhibé de manière *directe* seulement par l'unique élément de la boucle qui le précède immédiatement.

Ceci dit, le terme même de rétroaction implique que chaque élément exerce un contrôle (indirect) sur lui-même via les autres éléments de la boucle. Certains considéreront sans doute comme triviale – mais peut-être cette impression s'atténuera-t-elle à la réflexion – la constatation suivante. Quel que soit le nombre d'éléments d'une boucle simple, quel

que soit le rapport du nombre d'interactions négatives au nombre d'interactions positives et quel que soit l'ordre des interactions positives et négatives : ou bien *chacun* des éléments exerce un contrôle *négatif* sur sa propre expression, ou bien *chacun* des éléments exerce un contrôle *positif* sur sa propre expression. Laquelle de ces deux situations se présente, dépend exclusivement de la *parité* du nombre d'interactions négatives dans la boucle ; si ce nombre est impair, chaque élément de la boucle exerce un contrôle négatif sur sa propre évolution, si ce nombre est pair, chaque élément de la boucle exerce un contrôle positif sur sa propre évolution. Pour cette raison, nous qualifions de *boucles négatives* les boucles à nombre impair d'interactions négatives et de *boucles positives* les boucles à nombre pair d'interactions négatives. Ce qui vient d'être dit apparaîtra de manière moins abstraite par la suite.

On peut raisonnablement s'attendre à ce que le comportement d'une boucle soit très différent selon que chacun de ses éléments exerce un effet négatif ou un effet positif sur sa propre expression. On doit donc s'attendre à ce que les comportements des boucles négatives et celui des boucles positives soient très différents.

Section 2.— *Comportement des boucles négatives* (homéostasie)

Dans le cas d'une boucle négative, toute augmentation du niveau d'un élément entraîne (de manière indirecte, sauf pour le cas particulier d'une boucle à un seul élément) une *diminution de son taux de production*. Il en résulte une tendance à la stabilisation autour d'une valeur, stabilisation qui est le plus souvent obtenue par des corrections successives, alternativement vers le haut et vers le bas. L'exemple par excellence de la boucle négative est le *thermostat*. Le système contrôlé par un thermostat dispose d'une source de chaleur qui, en l'absence de contrôle, fonctionnerait continuellement à son niveau maximum. Le thermostat a pour effet d'interrompre la production de chaleur lorsque la température du système atteint la valeur voulue. Il en résulte une oscillation régulière de la température du système dans une «fourchette» située de part et d'autre de la température demandée ; l'idéal serait dans ce cas un état stable correspondant au maintien de cette température, mais comme tous les idéaux il n'est jamais réalisé. En termes logiques, on peut dire qu'il s'agit d'une boucle de rétroaction négative, où la température exerce, par une série d'intermédiaires, un

contrôle négatif sur la source de chaleur dont le fonctionnement tend à augmenter la température du système. *En pratique, ce type de régulation tend à maintenir la valeur d'une variable au voisinage d'un niveau défini, inférieur à celui qu'elle atteindrait dans un système non régulé. C'est ce qu'on appelle une régulation homéostatique.*

Section 3.– *Comportement des boucles positives (autocatalyse indirecte)*

Dire que chaque élément d'une telle boucle exerce un effet positif (en général indirect) sur sa propre évolution, revient à dire que chaque élément tend à garder la valeur qu'il avait auparavant : élevée si elle l'était déjà auparavant, basse si elle l'était déjà auparavant. C'est ce qu'on appelle un comportement *autocatalytique*. On parle d'autocatalyse pure dans le cas d'un système formé d'un seul élément nécessaire à sa propre production. Il est clair que si la présence préalable d'un élément est requise pour sa production, ou bien l'élément est absent, et il le reste indéfiniment, ou bien il est présent et, sauf contraintes additionnelles, il le reste indéfiniment : cercle vicieux. On trouve le même genre de situation (possibilité de maintien dans l'un ou l'autre de deux états stables) pour les autres boucles positives. Ainsi, dans le cas d'une boucle formée de deux éléments antagonistes dont chacun exerce un effet négatif sur la production de l'autre, on peut se rendre compte que le système peut se stabiliser dans l'une ou l'autre de deux positions, correspondant à la présence et à la synthèse à un taux significatif *soit* de l'un, *soit* de l'autre élément.

D'une manière plus générale, on peut dire que les boucles positives ont l'intéressante propriété de permettre un choix entre deux situations stables : à l'opposé du caractère normatif, homéostatique, des boucles négatives, les boucles positives ont un comportement diversificateur, différenciatif.

Un système à deux éléments, formant une boucle positive, peut se représenter comme un «paysage» comportant deux bassins séparés par une ligne de partage («séparatrice») dont le point le plus bas est un col. Ce dernier correspond à un état stationnaire instable tandis que les deux bassins correspondent aux domaines d'attraction dont les points les plus bas sont les deux états stables. Ainsi un tel système a trois états stationnaires mais deux seulement d'entre eux (les deux états stables) sont des «attracteurs», c'est-à-dire, des terminus possibles des trajectoires du système. A titre de comparaison, les boucles négatives

dont il a été question dans la section précédente n'ont qu'un attracteur, qui peut être un état stable ou une trajectoire fermée («cycle limite») autour d'un état instable.

On trouvera une démonstration de nos propositions sur le comportement des boucles négatives et positives dans Van Ham et Lasters (1978).

Section 4. – Réseaux comportant plus d'une boucle de rétroaction

Comme je l'ai fait remarquer plus haut, le fonctionnement de systèmes comportant plus d'une boucle de rétroaction est généralement très difficile, voire impossible à se figurer en l'absence d'un formalisme approprié. Est-il, par exemple, intuitif que le système à trois variables

$$\begin{aligned} a &= \beta \cdot \bar{\gamma} \\ b &= \bar{\gamma} \cdot \bar{\alpha} \\ c &= \bar{\alpha} \cdot \beta \end{aligned}$$

donne lieu à un choix entre trois états stables alors que le système à 4 variables :

$$\begin{aligned} a &= \beta \cdot \bar{\gamma} \\ b &= \bar{\gamma} \cdot \delta \\ c &= \delta \cdot \bar{\alpha} \\ d &= \bar{\alpha} \cdot \beta \end{aligned}$$

donne lieu à un seul état final, qui peut être périodique ?

Ce genre de problèmes se résout pourtant en quelques minutes à l'aide de la méthode décrite dans la section 5. Nous avons analysé de la sorte un grand nombre de systèmes et sommes arrivés à la conclusion que :

- 1) la présence d'au moins une boucle négative est une condition nécessaire (mais non suffisante) pour que le système soit susceptible d'oscillations permanentes
- 2) la présence d'au moins une boucle positive est une condition nécessaire (mais non suffisante) pour que le système puisse admettre plus d'un attracteur. Une démonstration formelle de ces propositions a été proposée récemment par Van Ham (1982).

Un circuit peut cumuler ces deux types de propriétés, par exemple en donnant lieu à un choix entre deux attracteurs dont l'un est cyclique et

l'autre pas ; pour que ce soit le cas, une condition nécessaire, mais non suffisante, est que la structure comporte au moins une boucle positive (responsable de l'existence de deux attracteurs) *et* une boucle négative (responsable de ce que l'un d'eux soit cyclique). Les deux circuits évoqués plus haut sont des exemples de ce que cette condition ne soit pas suffisante. En effet, tous deux comportent à la fois des boucles positives et des boucles négatives ; mais l'analyse montre que l'un d'eux donne lieu à des attracteurs multiples non cycliques, l'autre à un attracteur unique qui est cyclique.

Les principes qui viennent d'être énoncés ont sans doute un intérêt général, et ils peuvent être utiles notamment pour éliminer des classes de modèles : ainsi, il est inutile de chercher l'interprétation d'un phénomène périodique stable dans une classe de modèles qui ne comporteraient pas de boucle négative. Cependant, pour connaître vraiment le comportement d'un système, il faut l'analyser de manière plus approfondie (voir section 5).

Section 5. – *Un mode de description, d'analyse et de synthèse
de systèmes dynamiques : la cinétique logique*
(THOMAS, 1973, 1978, 1979 ; THOMAS et VAN HAM, 1974)

Nous associons à chaque élément des systèmes dont nous voulons décrire l'évolution dynamique, une variable logique (α , β , γ , ...) qui prend la valeur 1 lorsque le *niveau* de l'élément considéré atteint son seuil d'efficacité, 0 sinon, et une fonction logique (a , b , c , ...) qui prend la valeur 1 lorsque le *taux de production* de l'élément considéré est suffisant pour devoir être pris en considération. Ainsi, si les éléments du système sont les produits de gènes, $\alpha = 1$ signifie que le produit est *présent* à une concentration suffisante pour être efficace, $a = 1$ signifie que le produit est en *voie de synthèse effective* (en d'autres termes, que le gène est allumé). Supposons, par exemple, qu'un gène soit éteint depuis un bon moment ($a = 0$) ; son produit, dont la durée de vie est limitée, doit avoir disparu ($\alpha = 0$). Si maintenant un signal allume le gène, on a aussitôt $a = 1$ (par définition de a) ; quant au produit, il est encore absent ($\alpha = 0$), mais il est en voie de synthèse puisque le gène est allumé, et sauf avis contraire il atteindra sa concentration efficace ($\alpha = 1$), mais seulement avec un retard t_α qui dépend notamment de son taux de synthèse. A partir de ce moment, tant que le gène restera allumé ($a = 1$) ce produit restera présent ($\alpha = 1$). Si un signal éteint le

gène ($a = 0$) la concentration du produit décroîtra (par dégradation, diffusion, etc ...) et tombera sous la concentration efficace ($\alpha = 0$) après un délai caractéristique $t_{\bar{\alpha}}$. En d'autres termes, les changements de valeur de a (en génétique, allumage ou extinction d'un gène) peuvent être vus comme des *ordres* de synthétiser, ou au contraire de ne plus synthétiser, un produit; les *effets* de ces ordres (apparition ou disparition du produit α) ne se manifesteront qu'avec un délai, que nous désignerons par t_{α} lorsqu'il s'agit d'un enclenchement, par $t_{\bar{\alpha}}$ lorsqu'il s'agit d'un déclenchement. (Fig. 1) On peut se rendre compte que les valeurs logiques de a et de α seront égales en état de régime (gène allumé, et produit présent, ou au contraire gène éteint, et produit absent) mais qu'aussitôt après un changement de valeur de a (allumage ou extinction du gène) les valeurs de a et de α seront momentanément différentes.

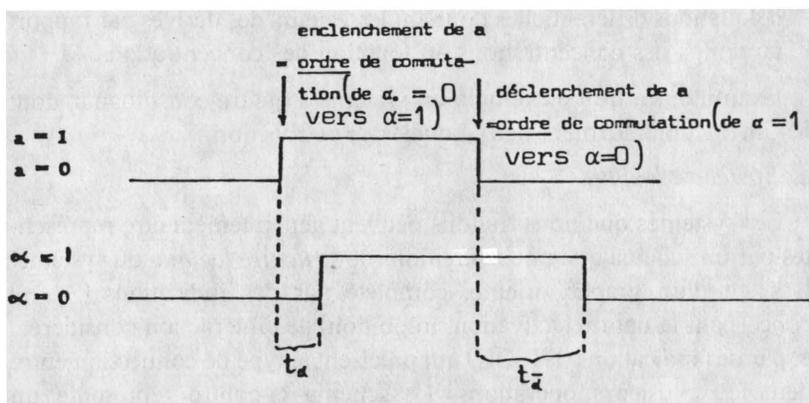


FIGURE 1.

La variable α adoptera la nouvelle valeur de a (exécution de l'ordre) après un délai caractéristique, à moins cependant qu'un contre-ordre (nouveau changement de valeur de a) ne survienne avant que l'ordre n'ait été exécuté (*).

(*) Nous raisonnons dans ce cas comme si l'ordre était purement et simplement annulé. Dans la plupart des cas, le gain en simplicité qui résulte de cette convention simplificatrice l'emporte de loin sur la gravité de la déformation éventuellement introduite. En tout état de cause, on peut, lorsque cela se révèle nécessaire, utiliser des conventions plus raffinées (voir VAN HAM, 1975).

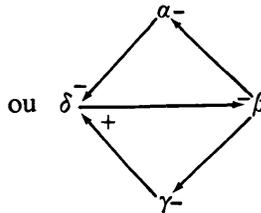
On peut se rendre compte :

- que les variables α , β , γ , ... se comportent comme les *variables de mémorisation* associées aux fonctions a, b, c, ... respectivement, en ce sens qu'en général la valeur de α est celle qu'avait a dans la tranche de temps précédente. Ceci permet d'appliquer à notre formalisme toute la technologie des concepteurs de circuits logiques (FLORINE, 1964).
- qu'un état pour lequel le «vecteur booléen» associé aux variables et le vecteur associé aux fonctions ont la même valeur ($\alpha = a$, $\beta = b$, etc ...) est un état stable ;
- que la relation de a à α est, en gros, une relation de dérivée à primitive (a représente un taux de synthèse, α , une concentration) en sorte que des équations logiques qui donnent les valeurs de a, b, c, ... en fonction de celles de α , β , , ... sont partiellement homologues d'équations différentielles donnant les valeurs des dérivés par rapport au temps des concentrations en fonction des concentrations.

Examinons à titre d'exemple un système à quatre constituants, dont les interactions forment deux boucles de rétroaction.

a. *Structure logique*

Les systèmes que nous traitons peuvent généralement être représentés par un schéma que nous qualifions de *structure logique* du système. Il s'agit d'un graphe orienté, complété par des indications (+, -) concernant la nature (activation, inhibition) de l'interaction considérée, et par des indications (ET, OU) qui précisent le type de connection entre deux ou plusieurs opérations. Le schéma ci-contre représente un système formé de deux boucles de rétroaction conjuguées (Cf. LECLERCQ et THOMAS, 1981). En ce qui concerne, par exemple, l'élément δ du système, le schéma indique que le produit δ est synthétisé à un taux significatif ($d = 1$, gène «on») si l'une au moins des deux conditions suivantes est remplie : absence du produit α , présence du produit γ . Si le schéma indiquait un ET au lieu d'un OU, il faudrait que les deux conditions soient remplies pour que δ soit synthétisé.



b. *Equations logiques*

Nos systèmes peuvent être décrits par un ensemble d'équations logiques du type :

$$a = \varphi_1(\alpha, \beta, \gamma, \dots)$$

$$b = \varphi_2(\alpha, \beta, \gamma, \dots)$$

Ainsi la structure logique décrite dans le paragraphe précédent peut s'écrire :

$$a = \beta$$

$$b = \delta$$

$$c = \beta$$

$$d = \bar{\alpha} + \gamma$$

c. *Table des états*

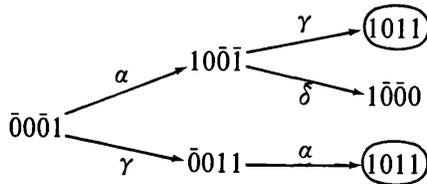
Pour un système à n variables binaires, il y a 2^n combinaisons de valeurs des variables («états» des variables). Ces combinaisons peuvent être représentées chacune par une *suite de chiffres* binaires, qu'on peut traiter en pratique comme un *nombre* binaire caractéristique de l'état : par exemple, l'état pour lequel $\alpha = 1$, $\beta = 0$, $\gamma = 1$ et $\delta = 1$ se représente 1011. Partant du système d'équations logiques, on peut construire une

TABLE I

$\alpha\beta\gamma\delta$	abcd
$\bar{0}\bar{0}\bar{0}\bar{0}$ (1)	1111
$\bar{0}\bar{0}\bar{0}1$	1011
$\bar{0}\bar{0}11$	1011
$\bar{0}\bar{0}1\bar{0}$	1111
$01\bar{1}\bar{0}$	0101
$01\bar{1}1$	0001
$01\bar{0}1$	0001
$010\bar{0}$	0101
$\bar{1}100$	0100
$\bar{1}1\bar{0}\bar{1}$	0000
$\bar{1}1\bar{1}1$	0001
$\bar{1}1\bar{1}\bar{0}$	0101
$1\bar{0}1\bar{0}$	1111
$1\bar{0}11$	1011
$10\bar{0}\bar{1}$	1010
$1\bar{0}\bar{0}0$	1110

table de Veitch (ou de Karnaugh), que nous désignerons ici par *table des états*. Pour chaque état des variables (combinaison de valeurs des variables $\alpha, \beta, \gamma, \dots$) cette table donne les valeurs correspondantes des fonctions a, b, c, ... (Table I).

Ainsi, dans l'exemple choisi quand les variables $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ont respectivement les valeurs 0, 0, 0, 1 (état 0001), les équations (voir paragr. b) donnent aux fonctions a, b, c, d, respectivement, les valeurs 1, 0, 1, 1. On peut donc représenter cet état par : $\alpha, \beta, \gamma, \delta/a, b, c, d = 0001/1011$ et, de manière plus condensée, par $\bar{0}\bar{0}\bar{0}1$, où le nombre binaire représente l'état des variables et les tirets suscrits indiquent quelles variables sont l'objet d'un ordre de commutation (Thomas et Van Ham, 1974) ; dans le cas présent α et $\gamma = 0$, mais a et c = 1 : les variables α et γ sont donc toutes deux l'objet d'un ordre de passer de 0 à 1, ce que nous notons $\bar{0}$ dans la représentation condensée. Il est clair que l'état suivant $\bar{0}\bar{0}\bar{0}1$ sera 1001 ou 0011 selon que la variable α ou la variable γ atteindra la première la valeur 1 (*), en d'autres termes, selon que le délai t_α ou délai t_γ aura été le plus court. Si on se reporte à la table des états, on verra que l'état 1001 peut être représenté de manière plus explicite par $10\bar{0}\bar{1}$ et l'état 0011 par $\bar{0}011$. On peut donc écrire



et ainsi de suite. L'état 1011 a été cerclé pour signifier qu'il s'agit d'un *état stable* ; en effet, on peut se rendre compte que cet état ne comporte aucun ordre de commutation. On arrive ainsi à un *graphe des séquences d'états*, qui présente de profondes similitudes avec la «toroidal map» décrite indépendamment par Glass et Kauffman (1973) ; Glass (1975). La différence principale est probablement la suivante. Glass et Kauffman consignent sur une sorte de matrice de Karnaugh (toroidal map) les 2^n états du système et indiquent par des flèches les transitions possibles. Plutôt que cette structure «fermée» nous utilisons

(*) Nous ne représentons pas *explicitement* la possibilité selon laquelle α et γ commuteraient de manière exactement simultanée. Si ce cas se présentait, la transition $\bar{0}\bar{0}\bar{0}1 \xrightarrow{\alpha, \gamma} 1011$ serait cependant prise en compte sans problème par les méthodes de simulation utilisées.

une structure «ouverte», un graphe orienté où un même état binaire peut se retrouver plusieurs fois. Lorsqu'un même état binaire réapparaît le long d'une même séquence d'états, nous nous posons la question de savoir si la séquence doit être considérée comme un cycle, en d'autres termes, si les deux états symbolisés par une même représentation binaire sont bien équivalents. Ainsi, la séquence :

$$\bar{0}\bar{0}\bar{0}\bar{0} \xrightarrow{\alpha} 1\bar{0}\bar{0}\bar{0} \xrightarrow{\beta} \bar{1}10\bar{0} \xrightarrow{\bar{\alpha}} 010\bar{0} \xrightarrow{\delta} 0\bar{1}01 \xrightarrow{\beta} \bar{0}\bar{0}\bar{0}1 \xrightarrow{\alpha} 10\bar{0}\bar{1} \xrightarrow{\delta} 1\bar{0}\bar{0}\bar{0}$$

comporte deux occurrences de l'état binaire $1\bar{0}\bar{0}\bar{0}$. Ces deux états sont-ils équivalents ? Non, car dans le premier cas, les ordres de commutation de β et de γ étaient déjà donnés dans l'état précédent ($\bar{0}\bar{0}\bar{0}\bar{0}$), alors que dans le second cas l'ordre de commutation de β n'était pas présent dans l'état précédent, mais celui de γ était déjà présent deux états en amont ! Le symbolisme que nous avons adopté récemment complète la description binaire de l'état par des souscrits indiquant depuis combien d'états telle ou telle commutation est demandée. Dans le cas présent, les deux états $1\bar{0}\bar{0}\bar{0}$ seront donc désignés : $1\bar{0}\bar{0}\bar{0}_1$ et $1\bar{0}\bar{0}\bar{0}_2$, respectivement. Deux états indicés différemment *sont* différents ; deux états indicés de même *peuvent* être identiques. Pour une analyse plus approfondie, voir Leclercq et Thomas (1981).

Sans entrer dans les détails, disons qu'une manière généralement satisfaisante de procéder consiste à construire le graphe des séquences d'états et à s'arrêter lorsqu'on retrouve un état indicé déjà trouvé en amont sur le même chemin, quitte à vérifier ultérieurement si la séquence intermédiaire peut constituer un cycle. *Cette phase de l'analyse nous permet d'identifier les états finaux (stables, cycliques, et éventuellement chaotiques) du système, et les chemins qui y conduisent*, indépendamment de toute hypothèse préalable sur les valeurs des délais.

Une autre représentation consiste à représenter les états binaires d'un système à n variables sur les sommets d'un n -cube (voir par exemple Thomas et Van Ham, 1974 ; Glass, 1975 ; Glass et Pasternak, 1978 ; Thomas, 1979), des flèches le long des arêtes symbolisant les transitions. Cette représentation est souvent commode (surtout lorsque $n \leq 3$!) mais ne permet évidemment pas de faire de discrimination entre deux occurrences non équivalentes d'un même état binaire (cf paragraphes précédents). Une différence entre les systèmes traités par Glass et ceux que nous traitons est que Glass exclut la possibilité qu'un

élément d'un système puisse agir de manière directe sur sa propre évolution («no self input»). Cette attitude se manifeste au niveau de la représentation par n-cubes par le fait que dans les systèmes utilisés par Glass chaque arête porte une flèche et une seule ; dans les systèmes que nous traitons, une arête peut porter 2, 1 ou 0 flèches.

d. *Conditions pour que le système suive tel ou tel chemin ; analyse de stabilité des cycles*

En raisonnant comme p. 364, on peut déterminer quelles sont les conditions sur les valeurs des délais pour que telle séquence soit suivie plutôt que toute autre. Sans entrer dans le détail, disons que les conditions se présentent comme un ensemble d'inégalités (et, occasionnellement, l'une ou l'autre égalité) entre des valeurs de délais, ou, plus généralement, entre combinaisons linéaires entières de valeurs des délais.

En particulier, si l'examen du graphe des séquences d'états suggère la possibilité d'un chemin cyclique, le traitement dont il est question dans ce paragraphe constitue une *analyse de stabilité* du cycle. En pratique, on peut distinguer des cycles *stables*, caractérisés par le fait que les conditions de stabilité ne comportent que des inégalités, et des cycles *instables* dont les conditions de stabilité comportent au moins une égalité exacte entre somme de valeurs de délais. *Cette phase de l'analyse nous permet de préciser de quoi dépend que tel ou tel chemin soit suivi à partir de tout état choisi comme état initial, et en particulier, de quoi dépend la persistance éventuelle d'une situation périodique.*

e. *Délais*

A cet égard, diverses attitudes sont possibles

- α) On peut attribuer à chaque délai une valeur bien déterminée. Cette attitude est l'attitude *asynchrone* que je qualifierais de *généralisée* dans la mesure où, pour une même fonction, les valeurs de délai sont généralement distinctes à l'enclenchement et au déclenchement.
- β) On peut raffiner cette optique en remarquant que, par exemple dans une population de cellules dont chacune est considérée comme un exemplaire du système étudié, on peut attribuer à chaque délai une *valeur moyenne* sur la population et une *distribution*. Cette intrusion du stochastique a déjà été utilisée dans un cas concret (intégration du bactériophage λ : Thomas, 1979) et a été automatisée

par Van Ham et Dehoeck (1979). On peut aller plus loin et admettre que pour une cellule donnée un délai peut apparaître avec des valeurs différentes d'une occurrence à l'autre (voir Richelle, 1979).

γ) Enfin, il serait infiniment plus général et plus satisfaisant pour l'esprit de pouvoir considérer la valeur moyenne de chaque délai (ou la valeur tout court, si on se place en termes déterministes) comme une fonction de l'état du système. Jusqu'ici cette généralisation n'a été utilisée à notre connaissance, que dans le traitement du problème «des trois prisonniers» (Thomas, non publié) et dans le mémoire de A. Verhamme.

Section 6. – *Démarche inverse (induction ou «synthèse» (*)) : comment construire un circuit qui satisfasse à des exigences déterminées ?*

Jusqu'ici, nous sommes partis d'une structure logique, soit purement abstraite, soit représentant le «squelette» d'un modèle, et nous nous sommes demandé quels comportements dynamiques pouvaient être engendrés par cette structure. A l'opposé de cette démarche analytique, on peut se demander dans quelle mesure on peut partir d'un comportement observé ou souhaité et remonter de manière aussi rationnelle que possible à une structure logique qui permette, ou qui impose, ce comportement : démarche «synthétique» (*) ou, si l'on préfère, inductive.

En termes moins techniques, mais sans doute plus ambitieux : *dans quelle mesure peut-on procéder de manière rationnelle à l'induction d'un modèle à partir des comportements observés, une démarche qui habituellement demande plus à l'intuition qu'au raisonnement ?* Il va sans dire que lorsque l'on procède dans ce sens les solutions sont multiples : formellement, on peut toujours rendre compte d'une situation par une multitude de modèles. Nous circonscrivons cependant

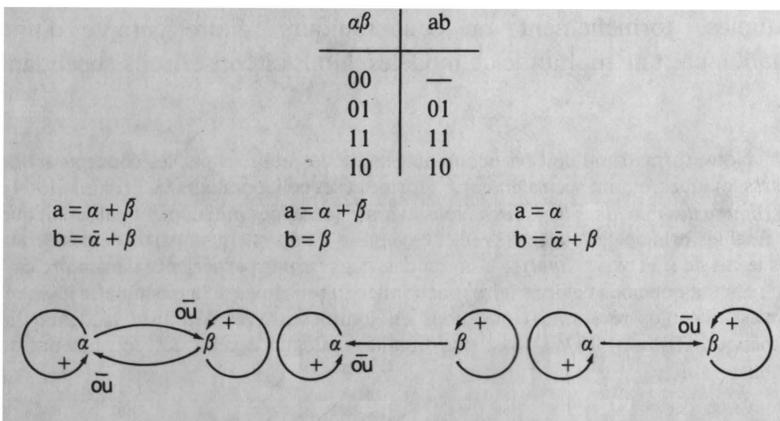
(*) Notre formalisme doit beaucoup aux méthodes utilisées par les concepteurs de circuits logiques, et tout spécialement J. Florine et ses collaborateurs (J. FLORINE, 1964 : *La synthèse des machines logiques*). Nous avons été frappés initialement par le fait que nos finalités principales étaient inverses : *synthèse* d'un système à partir de desiderata dans le cas de J. FLORINE, *analyse* d'un modèle suggéré par l'expérience dans notre cas. Il en résultait que nous devions faire fonctionner en sens inverse la machinerie logique. Ce n'est que plus récemment que nous en sommes arrivés à utiliser la démarche synthétique (THOMAS, 1979), avec une finalité analogue à celle des concepteurs de circuits.

le problème comme suit : à supposer que les éléments essentiels au fonctionnement du système aient été identifiés, quels types de connections entre ces éléments rendent compte du comportement observé (ou l'imposent) ?

Même ainsi, les solutions restent évidemment multiples. Notre prétention est double :

- a) trouver des interactions, parmi les plus simples, entre les éléments du système, qui lui octroyent les caractéristiques voulues ;
- b) savoir ce qu'il y a de commun entre tous les modèles acceptables ; en d'autres termes, quelles contraintes doivent absolument être satisfaites pour qu'un modèle rende effectivement compte de la situation considérée.

Pour illustrer la démarche, je choisirai un exemple particulièrement simple quoique non trivial. L'expérience montre que tel système vivant peut persister dans l'un ou l'autre de trois états stables, caractérisés respectivement par le fonctionnement du gène A seul, du gène B seul et des deux gènes. A supposer que cette possibilité de choix résulte des interactions entre les gènes A et B, quelles sont les interactions les plus simples qui puissent l'engendrer ? Nous exprimerons simplement dans une table des états que les états 10, 01 et 11 sont des états stables (ce qui revient à écrire que pour $(\alpha\beta) = 10$, $(ab) = 10$ etc...). Par contre rien n'est précisé pour l'état 00, ce qui revient à dire que pour l'état 00 on peut donner indifféremment à a et à b les valeur 0 ou 1 (4 combinaisons). On voit tout de suite que la combinaison $(ab) = (00)$ donnerait lieu à *quatre* états stables. Si on veut se limiter aux trois états stables spécifiés, à l'exclusion du 4^e, il reste trois possibilités, qui correspondent, respectivement, aux systèmes d'équations (et aux structures) logiques :



Remarquons :

1) que les systèmes à plus de deux états *stables* ou, plus généralement, à plus de deux attracteurs, sont loin d'être courants dans la littérature théorique. Le cas présent, quoique apparemment simple, n'est pas trivial : il correspond à un «paysage» à trois vallées, séparées par des lignes de crête provenant d'un sommet commun.

2) qu'il est facile de tirer d'un tel système d'équations logiques un système «homologue» d'équations différentielles ; on peut trouver sans difficulté des valeurs des paramètres telles que le système continu ait effectivement un «choix» entre trois états stationnaires stables, dont l'un ou l'autre est atteint selon l'état initial du système.

CHAPITRE III

RETOUR À LA BIOLOGIE : *Processus épigénétiques et différenciation*

Section 1. – *Analyse de systèmes bactériens et viraux*

Lorsqu'on parle de mécanismes de contrôle, on pense généralement au type de régulation qui, comme un thermostat, maintient la température (ou la concentration d'une hormone, ou ...) dans une «fourchette» de valeurs dont le niveau est sensiblement inférieur à celui qui serait atteint si le système fonctionnait à plein rendement. Comme je l'ai fait remarquer, l'objectif est, du moins dans beaucoup de cas, de maintenir le niveau constant, mais le mécanisme procède par corrections successives, alternativement vers le haut et vers le bas, en sorte que ce qui est observé en réalité est en général une oscillation ; l'amplitude et la période dépendent des temps de réponse des éléments du système de contrôle. Quels qu'en soient les détails, nous avons vu que ce type de contrôles pouvait être assuré par des boucles de rétroaction négatives.

Une propriété essentielle des êtres vivants, la capacité de *différenciation* a un objectif profondément différent du précédent, en ce sens qu'au lieu de contraindre le système à rester aussi constant que possible, elle lui permet une diversification, un *choix* entre deux ou plusieurs possibilités, qui peuvent ensuite être stabilisées.

Considérons, par exemple, un organisme complexe comme l'homme ou la drosophile. Notre corps comporte des cellules d'un grand nombre

de types, qui se caractérisent notamment par les protéines qu'elles sont capables de synthétiser. Ainsi, les réticulocytes synthétisent essentiellement des hémoglobines, les cellules de muscle, de l'actine et de la myosine, certaines cellules du pancréas, de l'insuline, etc ...

Or ces cellules contiennent le même ensemble de chromosomes, partant les mêmes gènes : elles contiennent l'information génétique nécessaire pour synthétiser des dizaines de milliers de protéines différentes, et pourtant elles n'en synthétisent chacune que quelques-unes à un taux élevé. Je voudrais rappeler à ce sujet les expériences de Briggs et King et de Gurdon, qui ont transplanté dans des ovules de batracien privés de noyau, le noyau d'une cellule différenciée comme, par exemple, une cellule d'intestin, et ont obtenu des embryons normalement différenciés : un noyau de cellule intestinale semble donc pouvoir apporter à l'ovule tout le complément d'information nécessaire à un développement normal.

La plupart (*) des gènes d'un organisme supérieur sont donc présents dans les noyaux de ses différentes cellules ; le problème est de savoir pourquoi chacun des noyaux n'exprime qu'une infime fraction de ses gènes, comment se prend la décision que telle cellule synthétise de la sérum-albumine, telle autre de l'insuline, et comment il se fait que la décision, une fois prise, soit maintenue à travers les générations cellulaires.

Les mécanismes responsables de ces décisions lors de la différenciation cellulaire sont loin d'être élucidés. Par contre, on connaît chez des organismes simples des situations apparentées, dont certaines sont très bien comprises. J'en décrirai deux de manière simplifiée.

La première a été mise en évidence par une expérimentation réalisée il y a plus de 20 ans déjà par Novick et Wiener (1957) et par Cohn et Horibata (1959) ; j'utiliserai cependant dans ma description l'acquis ultérieur dû à Jacob et Monod (1961). On sait que le colibacille (*E. coli*) synthétise normalement les enzymes qui permettent l'utilisation du glucose. Pour pouvoir utiliser le lactose deux activités enzymatiques supplémentaires sont nécessaires : une β -galactosidase, capable de scinder la molécule de lactose en ses deux constituants et une *perméase* spécifique, permettant à l'organisme de pomper efficacement le lactose

(*) Il serait abusif de dire que *tous* les gènes sont présents dans les différents types cellulaires : on connaît, par exemple, les remaniements qui se produisent lors de la maturation des cellules productrices d'anticorps (voir le chapitre par J. URBAIN).

du milieu. Le patrimoine génétique du colibacille comporte les gènes qui permettent la synthèse de la β galactosidase et de la perméase ; cependant, ces gènes ne sont exprimés qu'en présence d'un «inducteur», qui peut être un proche dérivé du lactose ou un autre β -galactoside. L'intérêt économique de ce mécanisme de régulation est évident : en pratique, l'organisme ne synthétise les enzymes nécessaires à l'utilisation du lactose que si du lactose est effectivement présent en quantité suffisante dans le milieu (Fig. 2). Mais le point auquel je voudrais en venir est autre : il existe une gamme de concentration d'inducteur (concentration que j'appellerai «critique») telle qu'en sa présence une cellule non induite reste non induite et une cellule induite reste induite

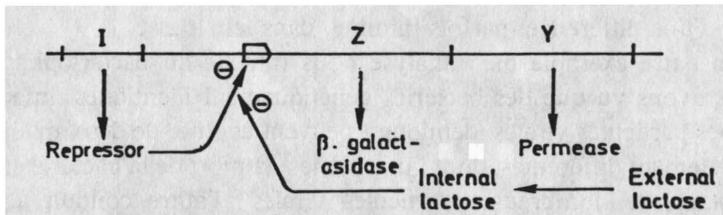


FIGURE 2.

Ce fait peut être mis en évidence très simplement en partant d'une population non induite, à laquelle on ajoute de l'inducteur au temps 0. Cette culture est aussitôt subdivisée en deux sous-cultures, A et B ; la première est diluée aussitôt, la seconde seulement après environ quinze minutes, la dilution étant choisie pour que la concentration d'inducteur devienne «critique». On constate que la seconde culture (B) a pu s'induire pendant l'intervalle de 15 minutes entre l'addition de l'inducteur et la dilution ; elle reste induite indéfiniment (et en particulier si on continue à la diluer au fur et à mesure de sa croissance, en maintenant désormais constante (et «critique») la concentration d'inducteur). Au contraire, la culture A n'a pas eu le temps de s'induire entre l'addition d'inducteur et la dilution ; elle restera indéfiniment non induite.

Nous nous trouvons donc en présence de deux cultures bactériennes génétiquement identiques et croissant dans des milieux identiques, mais qui, de manière non seulement stable, mais héréditaire, manifestent un phénotype différent ! Le mécanisme est passablement complexe, mais il

peut être décrit de manière très simplifiée comme suit : la présence de perméase est nécessaire à la pénétration de l'inducteur, et la présence d'inducteur interne est nécessaire à la synthèse de perméase. Cette espèce de cercle vicieux fait que dans une certaine gamme de concentration d'inducteur, une cellule qui contient déjà une molécule de perméase continuera à en synthétiser, alors qu'une cellule qui n'en contient pas continuera à ne pas en synthétiser. Nous retrouvons le type de comportement caractéristique des boucles de rétroaction positives (voir la section II,3). Cet exemple est l'un des cas les plus clairs et les mieux compris de différence *épigénétique*, c'est-à-dire de différence héréditaire qui ne soit pas liée à une différence de constitution génétique : deux lignées cellulaires de même constitution génétique se comportent héréditairement de manière différente à la suite d'une différence, parfois minime, dans leur passé.

Un autre exemple bien analysé nous ramène au bactériophage λ . Nous avons vu que des bactéries génétiquement identiques, infectées par des particules virales identiques, peuvent évoluer de deux manières radicalement différentes, dont l'une mène à la mort de la bactérie et à la libération de nombreuses particules virales ; l'autre conduit à une association symbiotique où le génome viral devient, sous le nom de *prophage*, partie intégrante du génome bactérien. La seconde évolution, nous l'avons vu plus haut, dépend de la synthèse, par l'un des gènes du virus (le gène «cI»), d'un répresseur capable de bloquer l'expression des autres gènes viraux. Mais le virus peut se réveiller si pour l'une ou l'autre raison l'immunité est perdue. C'est le cas, par exemple si le gène cI porte une mutation rendant le répresseur thermosensible et qu'on porte la culture à «haute» température (40° au lieu de 37°) : la population bactérienne se lyse peu après en produisant de nombreuses particules de virus.

Jacob et ses collaborateurs (EISEN *et al*, 1970) ont expérimenté sur des lignées dont le prophage portait d'une part la mutation précitée rendant le répresseur thermosensible, d'autre part des mutations qui rendent le virus suffisamment défectif pour que la bactérie survive à la perte de l'immunité. Ces lignées peuvent vivre indifféremment à basse température (l'immunité étant présente) ou à haute température (l'immunité étant absente).

Certaines de ces bactéries ont le remarquable comportement que voici. Si une culture immune est portée pendant une courte période (quelques minutes) à haute température, l'immunité disparaît, mais

réapparaît, comme on pouvait s'y attendre, dès que l'on revient à basse température ; par contre, si la culture a été portée à haute température pendant une période prolongée (quelques heures) l'immunité ne réapparaît pas lors du retour à basse température. A partir de maintenant on a, à basse température, deux types de cultures : celles qui n'ont pas été exposées durablement à haute température sont immunes et le restent indéfiniment ; celles qui ont été exposées durablement à haute température ont perdu à jamais leur immunité. *On peut vérifier que les deux types de cultures, qui manifestent une différence de comportement parfaitement héréditaire, sont cependant restées génétiquement identiques* ; de fait, connaissant le système, on peut passer à volonté de la phase immune à la phase non immune et réciproquement par un traitement approprié.

L'essentiel du mécanisme a été élucidé. Il consiste en une interaction entre deux gènes, le gène *cI* dont nous avons déjà parlé, responsable de la synthèse du répresseur, et le gène *cro*. Le produit de *cI* bloque l'expression de *cro* et le produit de *cro* bloque l'expression de *cI*. Un tel système est susceptible de deux états stables, l'un où le produit *cI* est présent, bloque l'expression du gène *cro* et permet de la sorte la poursuite de sa propre synthèse, l'autre où la situation est inversée. On reconnaît la *boucle positive* décrite à la section II, 3, dont nous avons fait remarquer qu'elle permet un choix entre deux états stables. Notons que dans le cas présent la situation réelle est considérablement plus complexe. En particulier, il se greffe sur la boucle précitée une seconde boucle positive : le répresseur est nécessaire à sa propre synthèse de régime, non seulement en ce qu'elle empêche la synthèse de l'antagoniste *cro*, mais aussi de manière directe (autocatalyse pure). Le lecteur intéressé trouvera dans l'ouvrage «Kinetic logic» (THOMAS, ed. 1979) des analyses formelles du mécanisme d'établissement de l'immunité et des conditions de réussite du processus global de lysogénisation.

Je voudrais signaler au passage une intéressante application de ce phénomène, application qui a été développée en collaboration avec le laboratoire du Prof. Errera (DAMBLY, TOMAN et RADMAN). C. Dambly a branché sur l'opéron dont fait partie le gène *cro*, les gènes bactériens responsables de la fermentation du galactose (*gal*). Une bactérie portant un tel prophage sera immune ou non selon que le gène *cI* ou le gène *cro* est actif ; mais la présence des gènes *gal* permet de distinguer au premier coup d'œil des colonies non-immunes des colonies immunes.

En effet, sur un milieu qui contient du galactose et un colorant approprié, les colonies où les gènes gal sont exprimés se colorent en rouge. Dans ces conditions, on pourra donc distinguer les colonies immunes (blanches) des colonies non immunes (rouges). Divers agents peuvent provoquer la transition de la phase immune vers la phase non immune. Cette transition peut résulter soit de l'inactivation mutationnelle du gène *ci* (effet *génétique*), soit de l'inactivation du répresseur, inactivation dont l'effet deviendra irréversible dès qu'elle aura permis la synthèse de suffisamment de produit *cro* pour que la synthèse ultérieure du répresseur soit compromise (effet *épigénétique*). Remarquons que dans ce système les variants génétiques et épigénétiques peuvent être distingués morphologiquement. Ceci revêt un grand intérêt dans l'étude d'agents mutagènes et potentiellement cancérogènes (radiations, agents chimiques, voir le chapitre de M. Errera), permettant dans chaque cas d'estimer de manière distincte les effets génétiques et épigénétiques.

Section 2. – *La différenciation des organismes supérieurs : cas concret de la différenciation des cellules hépatiques chez les mammifères*

L'idée que la différenciation puisse être une affaire de choix entre états stationnaires multiples (ou choix épigénétique) a été exprimée pour la première fois par Delbrück (1949) (qui utilisait l'expression d'«équilibres de flux»). Depuis, différents cas de différences épigénétiques stables ont été mis en évidence et élucidés, tant chez les bactéries et virus que chez des micro-organismes eucaryotes (Paramécie : Sonneborn, revue 1975). Le rôle des boucles d'autocatalyse a été exprimé de manière plus formelle par Monod et Jacob (1961).

Certaines notions discutées dans ce texte suggèrent une généralisation (voir aussi THOMAS *et al.*, 1976 ; 1978) : dans la mesure où la présence d'une boucle positive dans la structure d'un système est une condition nécessaire à l'existence d'attracteurs multiples, on peut conjecturer que tout processus de différenciation de nature épigénétique repose sur un mécanisme comportant une boucle positive.

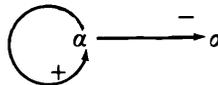
Songeon, à titre d'exemple, aux travaux, décrits au Titre IV, chapitre IV, qui utilisent la technique d'hybridation cellulaire pour tenter d'élucider les mécanismes de différenciation. Lorsqu'on constate que, de deux lignées cellulaires d'un même organisme, l'une (une lignée d'hépatome) synthétise de la serum albumine, l'autre (une lignée de

fibroblastes) ne synthétise pas cette protéine, la première réaction est en général de raisonner comme suit. Si la synthèse d'albumine est contrôlée par la présence de protéines de régulation diffusibles, ou la cellule de fibroblaste ne fait pas d'albumine parce qu'elle contient un répresseur que ne contient pas la cellule d'hépatome ; ou, au contraire, la cellule d'hépatome fait de l'albumine parce qu'elle contient un activateur que ne contient pas la cellule de fibroblaste. Deux aspects de ce raisonnement sont pour le moins frustrants :

a) Quoique l'explication en sciences se limite souvent à reculer d'un cran une difficulté, ici elle fait trop penser au dialogue de Molière : «Cur opium facit dormire ?» «Quia est in eo virtus dormitiva» Admettons que le fibroblaste ne fasse pas d'albumine parce qu'il contient un répresseur que ne contient pas la cellule d'hépatome ; mais qu'est-ce qui fait que le fibroblaste contienne ce répresseur et que la cellule d'hépatome ne le contienne pas ?

b) Outre l'impression de devoir remonter indéfiniment, le genre d'explication proposée ci-dessus ne donne aucune justification d'un fait essentiel : la *stabilité* de la situation. Les cellules des deux lignées transmettent fidèlement à leurs descendants, l'une la propriété de faire de l'albumine, l'autre la propriété de ne pas en faire. Mais comment ?

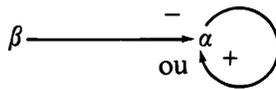
En fait, les deux difficultés s'estompent si l'on admet que la synthèse est contrôlée par une boucle de rétroaction positive. On pourrait dire, par exemple, que le répresseur (que nous symboliserons α) de la synthèse de serum albumine (σ) est lui-même synthétisé de manière autocatalytique :



Qu'une même protéine α exerce un contrôle positif sur sa propre synthèse et négatif sur la synthèse d'autre(s) protéine(s) n'a rien pour nous choquer : cette situation *existe* chez le phage lambda – toujours lui. Rien n'empêche du reste que la relation soit indirecte et que α soit un régulateur de la synthèse du répresseur. Nous savons déjà (voir plus haut) que la boucle α peut exister de manière parfaitement stable soit en position «on» (α présent et continuellement synthétisé) soit en position «off» (α absent et non synthétisé). Des cellules dont le matériel génétique comporterait une telle structure pourraient exister de manière stable en une phase «on» où le répresseur est présent et la

serum albumine absente, ou en phase «off» où le répresseur est absent et la serumalbumine présente.

Ce modèle très simple présente un inconvénient : si on sent très bien que le système peut exister sous deux formes stables, on ne voit pas comment pourrait s'opérer le choix entre les deux positions. Qu'à cela ne tienne : il est facile de trouver des structures régulatrices simples qui non seulement sont compatibles avec deux états stables, mais qui en outre permettent de comprendre comment peut s'opérer le choix. Voici deux telles structures :



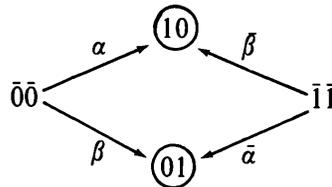
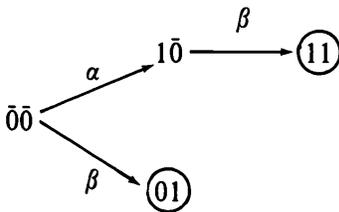
$$\begin{cases} a = \alpha + \beta \\ b = 1 \end{cases}$$



$$\begin{cases} a = \beta \\ b = \bar{\alpha} \end{cases}$$

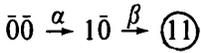
$\alpha\beta$	ab
$\bar{0}\bar{0}$	11
$\textcircled{01}$	01
$\textcircled{11}$	11
$1\bar{0}$	11

$\alpha\beta$	ab
$\bar{0}\bar{0}$	11
$\textcircled{01}$	01
$\bar{1}\bar{1}$	00
$\textcircled{10}$	10

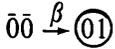


Remarquons que ces deux cas ne sont pas le fruit de la pure imagination. Tous deux existent, en un peu plus compliqué, chez le bactériophage lambda, l'un au niveau de l'établissement de la synthèse du répresseur, l'autre au niveau du choix entre synthèse de répresseur et synthèse du produit «cro».

La première structure proposée fait intervenir un régulateur β dont la synthèse est «constitutive» (non régulée). Partant d'une situation «vierge» où les différents régulateurs sont absents, on peut se rendre compte que le système suivra le chemin :



ou le chemin :

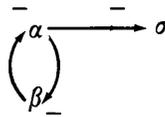


selon les vitesses de synthèse des produits α et β .

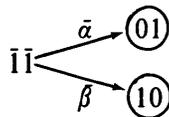
Dans l'état final, β sera nécessairement présent et synthétisé ; mais la substance α sera soit définitivement présente et synthétisée, soit au contraire définitivement absente et non synthétisée, selon qu'elle aura ou non atteint avant β sa concentration efficace.

La seconde structure fait intervenir une boucle formée de deux régulateurs antagonistes. Partant de la situation $\bar{0}\bar{0}$, la boucle s'installera (définitivement) en position $\textcircled{10}$ ou en position $\textcircled{01}$ selon que α ou β aura été *synthétisé* plus vite. Si on part de la situation $\bar{1}\bar{1}$, on tombe en $\textcircled{10}$ ou en $\textcircled{01}$ selon que β ou α se sera *dégradé* plus vite.

Considérons plus en détail un organisme dont le génome comporterait une boucle du type :



La boucle peut persister en l'un ou l'autre de deux états stables, l'état α et l'état β . Dans l'état α , la synthèse de la protéine σ sera bloquée, dans l'état β elle sera permise. L'état α représente donc le cas des fibroblastes, l'état β celui des cellules d'hépatome. Que se passe-t-il si on fusionne deux cellules, une de chaque type ? A moins que les concentrations d'état stationnaire de α et β ne soient limitantes, la cellule hybride contiendra initialement les deux régulateurs à des concentrations efficaces. Comme les régulateurs α et β inhibent la synthèse l'un de l'autre, les deux synthèses sont bloquées ; dans ces conditions, tout dépend des durées de vie des produits α et β . Si α tombe le premier sous sa concentration critique, le système se bloquera en position β , et réciproquement



Que l'expérience montre que l'hybride ne synthétise pas d'albumine (extinction) s'interprète dans ce modèle par l'idée que le régulateur β est dégradé le premier : le système se bloque de manière stable en position α , avec pour résultat une inhibition permanente de la synthèse de la protéine σ .

Remarquons que la synthèse d'autres protéines se comporte de manière diamétralement opposée : non seulement la synthèse par les gènes du parent producteur n'est pas éteinte, mais les gènes du parent non producteur sont activés. Ainsi, comme l'ont montré les Szpirer, lorsque l'on fusionne un fibroblaste de rat (qui ne produit pas le 3^e composant du complément (protéine C3)) et un hépatome de souris (qui synthétise ce produit – dans sa version «souris» évidemment), l'hybride synthétise du C3 des deux types – souris *et* rat.

Un aspect satisfaisant pour l'esprit du genre de modèles décrit plus haut est *qu'il n'est pas nécessaire d'invoquer des mécanismes différents pour rendre compte de l'extinction* telle qu'elle s'observe pour la synthèse d'albumine et *de l'activation* telle qu'elle s'observe dans le cas du C3. En effet, il suffit pour rendre compte de la différence que la synthèse d'albumine soit contrôlée par une boucle dont le régulateur α est le plus stable et que la synthèse de la protéine C3 soit contrôlée par une boucle dont le régulateur β est le plus stable.

De plus, ces modèles basés sur une boucle positive du type «– →» rendent compte à la fois de la stabilité des deux états et du fait que le résultat de l'hybridation peut être, comme l'a montré M. Weiss, influencé par le dosage de gènes. En effet, si les concentrations d'état stationnaire des régulateurs (α ou β selon le cas) sont largement supérieures à leur seuil d'efficacité, une fluctuation qui fasse tomber cette concentration sous le seuil dans une cellule doit être extrêmement rare. Mais si nous fusionnions une cellule en phase α et une cellule en phase β (avec pour résultat le blocage momentané des synthèses de α et de β), le résultat final (c'est-à-dire, que soit α , soit β tombe le premier sous sa concentration efficace) peut être affecté de manière critique par le dosage des gènes considérés.

Ceci dit, il serait abusif de faire croire que ces modèles rendent compte de tous les faits dans ce domaine ! Ainsi, lorsque l'on fusionne une cellule d'hépatome de rat qui ne produit pas d'AFP la synthèse de foetoprotéine (AFP) de souris se poursuit dans l'hybride, mais la synthèse d'AFP de rat n'est pas activée. C'est ce qu'on appelle un effet «*cis*» : dans ce cas particulier, tout se passe comme si les chromosomes

provenant du parent rat et ceux provenant du parent souris se comportaient «chacun pour soi». Les effets «cis» ne s'expliquent pas en termes d'effets de produits diffusibles ; quand ils se présentent on ne voit guère comment échapper à l'idée d'une modification structurale (modification au niveau du DNA ?) des chromosomes impliqués.

· Un point encore. Comme l'a montré Mary Weiss, il arrive qu'un hybride manifestant l'extinction d'un caractère donne naissance au cours des générations à de rares lignées qui réexpriment le caractère. Il semble bien que ces cas soient dus à la perte de chromosomes, l'interprétation la plus simple étant évidemment la perte de chromosomes porteurs de gènes répresseurs de la synthèse considérée. La plupart des auteurs s'expriment implicitement comme s'il était évident que les chromosomes à perdre sont ceux du parent non producteur : les gènes répresseurs étant exprimés dans le fibroblaste et inexprimés dans la cellule d'hépatome, on raisonne comme s'il était évident que cette situation se maintiendra dans l'hybride et que la synthèse d'albumine y sera réprimée par les gènes répresseurs fournis par le parent non producteur.

En d'autres termes, on raisonne comme si les gènes de contrôle eux-mêmes étaient nécessairement soumis à un contrôle de type *cis*. Il est parfaitement possible qu'il en soit ainsi. Cependant, il serait imprudent de ne pas envisager l'alternative d'un contrôle par substances diffusibles ; dans les modèles basés sur des boucles de rétroaction, si l'hybride est dans l'état « α » les 4 exemplaires (deux venant du parent producteur d'albumine, deux venant du parent non productif) du gène codant pour la protéine α seront fonctionnels, même si deux d'entre eux ne l'étaient pas dans l'une des cellules parentales.

Section 3. – *Application à d'autres disciplines*

Lorsque j'ai entamé, il y a plus de dix ans, ma tentative de formalisation des circuits génétiques, j'estimais que la possibilité de réussite était faible, mais qu'en revanche, si l'entreprise réussissait en génétique, elle pourrait être étendue à d'autres domaines, non seulement en Biologie, mais en dehors. En effet, la méthode proposée permet, en principe, de traiter les systèmes dynamiques dont les éléments agissent positivement ou négativement sur le taux de production ou d'expression l'un de l'autre, et ceci quelle que soit la nature de ces éléments et celle des interactions entre eux.

En fait, la méthode décrite ici a été utilisée en *génétique*, dans notre groupe (voir notamment THOMAS *et al.* 1976, THOMAS 1979) et à Paris par M. Brygoo (dans une étude de la différenciation sexuelles de protozoaires : Thèse 1980) ; sur des *circuits nerveux* (THOMAS 1979), mais aussi dans plusieurs domaines extérieurs à la biologie :

Urbanisme (Boolean formalism and urban development : Boon et de Palma, Chap. 18 dans THOMAS 1979).

Prise de décision (Processus de décision et Cinétique logique : DE PALMA, STENGERS et PAHAUT, 1982).

Météorologie (A Boolean approach to climate dynamics : C. NICOLIS, 1982).

RÉFÉRENCES

R. THOMAS, Editeur. Kinetic logic : a boolean approach to the analysis of complex regulatory systems in : *Lecture Notes in Biomathematics*. Vol. **29**, 507 pp. (1979).

R. THOMAS, *Advances in chemical physics*, sous presse (1983).

Remarque : le texte fait allusion à d'autres articles de différents auteurs ; vous en trouverez les références complètes dans l'un ou l'autre des deux textes et ouvrages proposés ici.

Du génie génétique naturel au génie génétique expérimental

INTRODUCTION

Par cette contribution nous voulons exprimer la gratitude et l'admiration que nous ressentons pour le rôle joué par le «Groupe du Rouge-Cloître», et, plus tard, par le groupe de «Rhodes» dans l'établissement et le développement de la Biologie Moléculaire en Belgique. C'est leur exemple de science à un très haut niveau international et du travail de pionnier, qui nous a stimulés, en tant que jeunes chercheurs à Gand, à nous consacrer à la Biologie Moléculaire. C'est aussi leur encouragement, leur sympathie et leur indéfectible amitié qui nous ont beaucoup aidés à réussir.

Les applications possibles qui peuvent découler de la connaissance fondamentale sont du plus grand intérêt et sont encore discutées aujourd'hui sous le titre de «manipulations génétiques» ou «génie génétique». Il est caractéristique et décevant de constater que c'est précisément au moment où les généticiens ont pris conscience des perspectives offertes par les manipulations génétiques, par exemple la production d'hormones de croissances humaines dans des bactéries, que l'on a découvert que la nature même est capable de transférer certains gènes d'un type d'organisme sur un autre de façon dirigée et efficace. Nous sommes arrivés à cette conclusion à la suite de nos recherches sur les cancers végétaux induits par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. A cette forme nouvelle et, jusqu'alors, insoupçonnée de parasitisme exercée par cette bactérie, nous avons donné le nom de «colonisation génétique».

LE CROWN GALL : UNE MANIPULATION GÉNÉTIQUE NATURELLE

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie Gram négative du sol dont l'inoculation à une plante de la classe des dicotylédones provoque

la formation de tumeurs, dont le pathologiste américain, Erwin Smith, qui a isolé cette bactérie, au début de ce siècle, avait pressenti qu'elles étaient des cancers végétaux. Cette maladie ne se déclare que chez les dicotylédones. Des excroissances analogues peuvent être provoquées par d'autres bactéries du sol, notamment *Agrobacterium rhizogènes* et *Agrobacterium rubi*, mais les tumeurs d'*Agrobacterium tumefaciens* sont celles qui sont le mieux analysées jusqu'à présent.

L'étude détaillée de ces tumeurs a démontré que la présence de bactéries est nécessaire uniquement pendant la phase initiale de la prolifération cellulaire. La destruction de ces bactéries, au moyen d'antibiotiques par exemple, quelques jours après l'infection, n'empêche pas pour autant la formation tumorale. La transformation des cellules saines est déjà déterminée car, en milieu stérile, le transfert de ces cellules cancéreuses à d'autres plantes n'entraîne pas la perte de leur propriété de division cellulaire anarchique. Ces cellules transformées sont également capables de se développer et de se multiplier *in vitro* dans un milieu qui ne contient pas d'hormones végétales. Ce point est important car les cellules saines des végétaux ont généralement besoin d'hormones, telles que l'auxine et la kinétine, pour leur croissance et leur multiplication. Des recherches récentes ont démontré que les cellules cancéreuses sont autotrophes pour ces hormones.

Le mécanisme de transformation de cellules végétales par induction bactérienne est resté longtemps un mystère. On soupçonnait un «principe inducteur de tumeurs» (ou «*Tumor-Inducing Principle*, TIP). On découvrit ensuite des substances spécifiques des tumeurs, uniquement assimilables comme source alimentaire par la souche bactérienne responsable de la formation tumorale. Une forme totalement neuve de parasitisme fut ainsi mise en évidence : les bactéries responsables de la transformation imposent aux cellules végétales de nouveaux gènes qui d'une part, assurent l'élaboration par les plantes transformées de produits qui peuvent lui servir de sources spécifiques de carbone, d'azote et d'énergie, et, d'autre part, veillent à la multiplication incontrôlée des cellules végétales infectées.

Depuis plus de quinze ans, on avait détecté la présence de dérivés inhabituels de l'arginine dans les tumeurs provoquées par les bactéries du sol. Après une longue et sérieuse controverse quant à la synthèse de ces substances dans les cellules saines, la majorité des chercheurs a acquis la certitude qu'elles sont bien spécifiques des tumeurs.

Les dérivés de l'arginine, dont les principaux sont l'octopine et la nopaline, résultent de la condensation de l'arginine et de l'acide pyruvique ou de l'acide α -cétoglutarique, ainsi que le montre la figure 1. On sait, depuis, que d'autres acides aminés peuvent également subir cette réaction et que la liste des produits synthétisés par la tumeur est probablement loin d'être exhaustive. Ces composés guanidiques sont généralement désignés sous le nom d'«opines». Le terme «opine» englobe non seulement les membres de la famille de l'octopine et de la nopaline, mais aussi toutes les substances synthétisées spécifiquement par les tumeurs et uniquement assimilées par les bactéries qui ont induit ces tumeurs. On a déjà pu établir qu'une de ces substances, l'agropine, se forme par combinaison d'un sucre avec un acide aminé.

Les tumeurs «crown gall» produisent des dérivés soit de la famille de l'octopine, soit de celle de la nopaline, mais jamais simultanément des deux. De plus, c'est la souche bactérienne, et non l'espèce végétale, qui détermine quel type d'opines sera synthétisé dans les cellules tumorales. On a constaté notamment que les bactéries du genre *Agrobacterium*, et uniquement celles-ci, sont capables de cataboliser les opines et de les utiliser comme unique source d'azote, de carbone et d'énergie. Il a fallu à nouveau distinguer deux groupes qui s'excluent mutuellement : l'un peut utiliser l'octopine et non la nopaline, l'autre la nopaline et non l'octopine. Enfin, l'induction de l'octopine dans les tumeurs va de pair avec le catabolisme de l'octopine par les bactéries, et vice versa. Le même phénomène a été observé pour la nopaline.

On peut considérer les souches de *A. tumefaciens* comme des parasites car elles contraignent les cellules végétales à synthétiser certains composés qu'elles seules peuvent assimiler puisque les végétaux sont incapables de dégrader les opines. Les deux groupes de bactéries possèdent en commun la capacité d'induire des tumeurs, mais ils ne sont pas en mesure d'interchanger leur source alimentaire.

Les choses en étaient là, lorsqu'au Laboratoire de Génétique de l'Université de Gand, un plasmide de grande taille a été découvert dont la présence dans les souches d'*Agrobacterium* était corrélée avec leur pathogénicité. Il a pu être établi qu'en effet ce plasmide qui reçut le nom de plasmide Ti (Tumour-inducing), était l'élément pathogène de *A. tumefaciens*. Peu après, il a été montré que les propriétés relatives à l'octopine et à la nopaline étaient spécifiées par des gènes portés par ce plasmide et que l'on pouvait distinguer deux types principaux de plasmides Ti grâce à ces propriétés : (i) les plasmides à octopine, qui

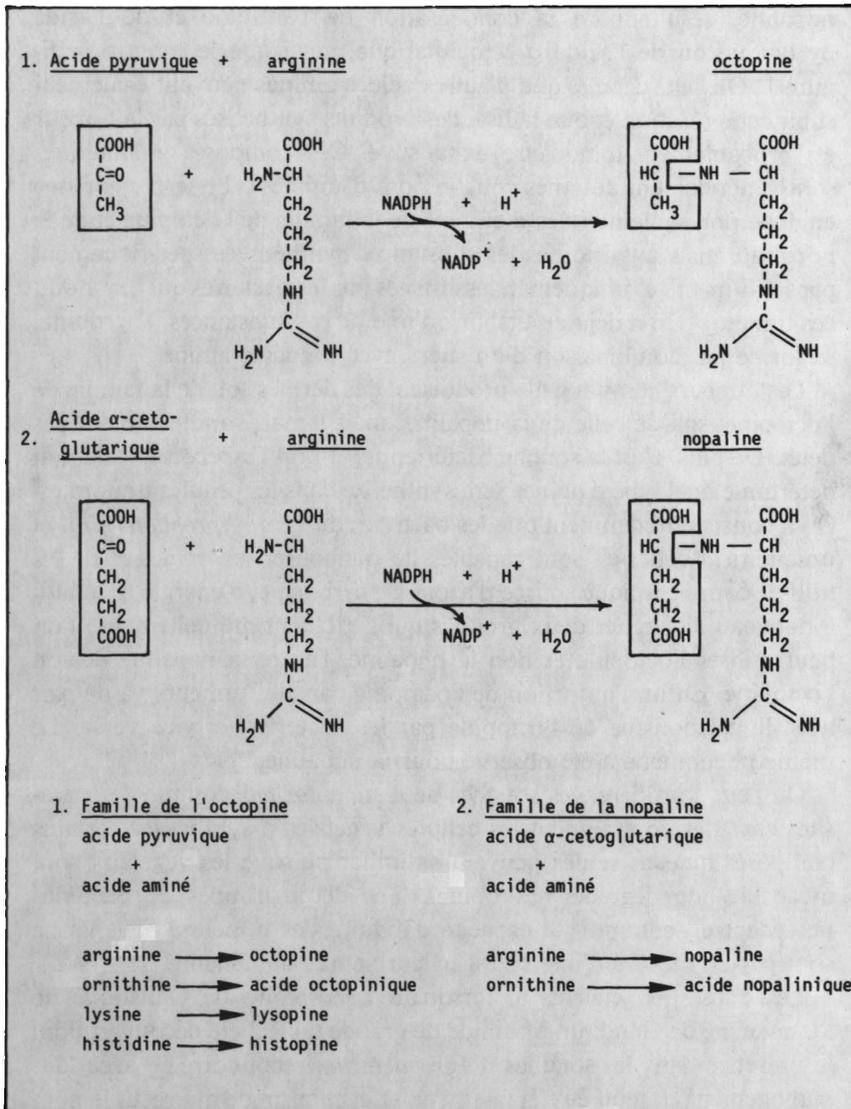


FIG. 1. – Biosynthèse de l'octopine et de la nopaline.
 Les deux produits sont élaborés par des enzymes différents réagissant spécifiquement avec l'acide pyruvique ou avec l'acide α -cétoglutarique.

confèrent aux souches d'*Agrobacterium* qui les hébergent la capacité de dégrader l'octopine et de provoquer la formation de tumeurs à octopine, et (ii) les plasmides à nopaline, qui confèrent aux souches d'*Agrobacterium* qui les hébergent la capacité de dégrader la nopaline et d'en déclencher la synthèse dans les tumeurs qu'elles provoquent.

La découverte des plasmides Ti a permis d'examiner les résultats antérieurs sous un angle nouveau et a donné une nouvelle impulsion aux recherches. Cette découverte allait permettre de vérifier l'hypothèse de transfert de gène. Cette hypothèse a été définitivement établie après démonstration de la présence dans les cultures de tissus de crown gall d'ADN homologue à un segment du plasmide Ti.

De nombreuses études ont porté sur l'identification des fonctions portées par les plasmides Ti. Ces travaux ont permis de dresser des cartes fonctionnelles de ces plasmides. L'examen de la carte d'un plasmide Ti à octopine, par exemple (figure 2) montre que celle-ci est divisée en plusieurs régions.

– La région Vir, qui porte des gènes dont l'expression est responsable de la pathogénicité de la bactérie ; les mutations abolissant la fonction pathogène sont localisées sur des segments voisins. Une autre fonction importante est appelée Tra, son expression est responsable du transfert, par conjugaison, du plasmide Ti d'une bactérie à une autre. Les plasmides Ti à octopine comportant au moins deux fonctions cataboliques, l'une, appelée Occ (octopine catabolism) permet à la bactérie qui héberge le plasmide d'utiliser l'octopine pour sa croissance. On sait qu'elle comporte au moins trois gènes de structure, groupés en un opéron, dont l'on spécifie la synthèse d'une perméase, et les deux autres, respectivement, d'une enzyme qui réalise la scission de la molécule d'octopine en arginine et pyruvate et d'une autre enzyme dont l'activité permet l'utilisation par la bactérie de l'arginine comme substrat carboné. L'autre fonction catabolique, Agc (agropine catabolism) moins bien connue, permet la dégradation de l'agropine, nouvelle opine découverte simultanément dans les tumeurs à octopine et les tumeurs de type zéro. Les fonctions cataboliques sont inductibles, de même que la fonction de transfert. Il a été montré que l'octopine induit simultanément la fonction catabolique Occ (octopine catabolism) et la fonction Tra. Ces deux fonctions, physiquement séparées sur le plasmide Ti sont placées sous le contrôle d'un même gène régulateur.

– La région T, est celle qui donne naissance au T-DNA, elle porte des gènes qui sont intégrés et exprimés dans la cellule végétale. Cette

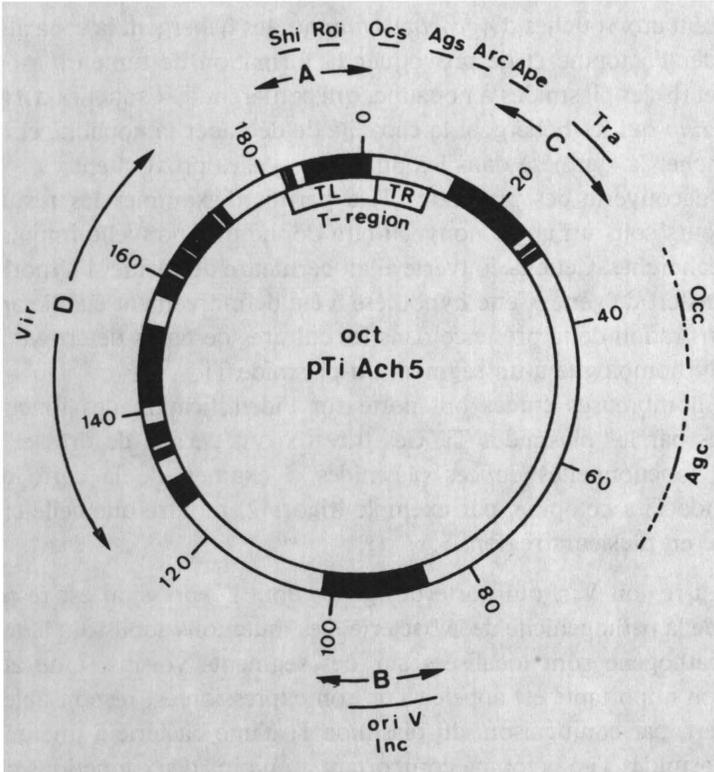


FIG. 2. — Organisation fonctionnelle du plasmide Ti à octopine.

Les chiffres indiquent les distances exprimées en kilobase (kb). Les zones noires reflètent l'homologie entre les deux types de plasmide. Les lettres A, B, C et D désignent les quatre groupes principaux d'homologie entre les deux types de plasmide Ti. Les régions B et D sont conservées dans d'autres plasmides Ti ou Ri. La région d'homologie A est interne à la région transférée sur le DNA de la plante. Shi et Roi, respectivement l'inhibition de pousses et de racines indiquent les caractéristiques phénotypiques des tumeurs. Les phénotypes dénommés Ocs (synthèse d'octopine), et Ags (synthèse d'agropine) gouvernent la synthèse des opines dans les cellules de plante transformées. Les régions codant des fonctions cataboliques sont désignées par Occ (catabolisme de l'octopine), Arc (catabolisme de l'arginine-ornithine) et Agc (catabolisme de l'agropine). La région d'homologie C contient au moins une partie des gènes responsables du transfert conjugatif entre bactéries (Tra). Le gène Ape (exclusion du phage AP1), est localisé dans cette région. La région d'homologie B est essentielle impliquée dans les contrôles de répliation des plasmides Ti (oriV). Les propriétés d'incompatibilité des plasmides Ti à octopine et à nopaline (Inc) pourraient être positionnées dans la même région. La région d'homologie D renferme de nombreuses boucles de substitution symétriques et est impliquée dans l'interaction entre *Agrobacterium* et la cellule végétale au cours de l'oncogenèse (Vir). Les insertions de transposon dans cette région entraînent une réduction de l'induction tumorale et un changement dans la spécificité d'hôte.

expression confère à cette cellule son phénotype caractéristique. La comparaison du T-DNA et de la région T montre qu'ils sont colinéaires : le transfert et l'intégration dans le génome de la cellule végétale se font sans réarrangement. On ne connaît pas le mécanisme par lequel le T-DNA est transféré et s'intègre dans la cellule de crown gall, mais on sait que ce mécanisme est indépendant de l'information génétique portée par le T-DNA. En effet, de nombreuses mutations ont été introduites dans la région T, mais aucune d'entre elles n'abolit la propriété de transfert et d'intégration du T-DNA. L'analyse de la région T montre qu'elle est bordée par des séquences répétées de 22 paires de bases environ que l'on retrouve également aux bords de la région T des plasmides à nopaline. Ces observations suggèrent donc que si la partie interne de la région T, celle qui devient le T-DNA, est passive dans le phénomène de transfert et d'intégration, par contre les séquences répétées qui bordent cette région jouent un rôle important dans ce phénomène. En d'autres termes, une région T n'est apparemment définie que par les séquences qui la bordent et qui constituent probablement des signaux de reconnaissance indispensables pour son transfert dans la cellule végétale et/ou son intégration. Les gènes impliqués dans ces deux processus ne sont pas connus et, encore moins, localisés. Ils peuvent faire partie soit du génome de la plante, soit être portés par la région Vir du plasmide Ti. Bien que la compréhension du mécanisme soit un problème d'intérêt primordial, nous pouvons, malgré notre ignorance, déjà utiliser les plasmides Ti pour introduire des séquences d'ADN hétérologue dans une cellule de plante : en effet, il suffit pour cela d'insérer cette séquence à l'intérieur de la région T, sans toucher aux séquences répétées qui la flanquent. Cette opération a été réalisée à plusieurs reprises et dans tous les cas étudiés les séquences étrangères ont été transférées et intégrées dans le génome de la cellule végétale.

Les études sur le T-DNA ont également porté sur l'identification des gènes qu'il porte, et dont nous avons dit que leur expression est responsable du phénotype des cellules de crown gall. Ces études ont mis en œuvre trois techniques complémentaires : la mutagenèse, l'analyse de la transcription et la détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN. On a pu ainsi montrer que le TL-DNA de la souche de crown gall A6 (octopine) porte 8 séquences transcrites correspondant à 8 ARN messagers. Chacune de ces séquences est entièrement contenue dans le T-DNA et elle est pourvue de ses propres signaux d'expression.

L'identification des différents messagers, par hybridation selon la technique dite «Northern» permet de dresser la carte de transcription du T-DNA et l'étude de l'homologie entre le T-DNA et les messagers correspondants a montré que ces 8 ARN messagers couvrent presque toute l'étendue du T-DNA. Les séquences codantes transcrites sont précédées et suivies de signaux caractéristiques des gènes eucaryotiques et il est parfaitement clair que l'expression de ces séquences est placée sous le contrôle de signaux portés par le T-DNA lui-même. L'étude la plus complète a porté sur le gène correspondant au messenger 3, dont on a pu montrer, par mutagenèse insertionnelle, qu'il est responsable de la synthèse de l'octopine. Ce messenger a pu être traduit *in vitro* et le produit de traduction a été identifié par immunochimie avec l'octopine déshydrogénase qui réalise la synthèse de l'octopine dans les tumeurs de crown gall. La séquence complète de ce gène a été déterminée et l'enchaînement des aminoacides du polypeptide correspondant en a été déduit. Ce travail établit définitivement la présence sur le T-DNA de gènes de structure fonctionnels. Il faut noter que ce gène ne porte pas d'introns, mais, mis à part cette absence d'introns, la comparaison entre ce gène et les gènes animaux connus montre que les principes généraux qui régissent l'expression des gènes chez les plantes et les animaux sont similaires.

Les études sur les autres séquences transcrites du T-DNA montrent que ces séquences sont responsables du caractère tumoral des cellules de crown gall. Ceci a pu être établi en éliminant, par mutagenèse site-spécifique, les différents produits de transcription, soit un à un, soit en combinaison. Ces observations ouvrent des perspectives inattendues, plus importantes que la seule compréhension du mécanisme qui rend ces cellules tumorales. En effet, il ressort de ce travail que le T-DNA porte des gènes qui contrôlent la différenciation des cellules végétales. La croissance tumorale résulte d'un mécanisme de contrôle essentiellement négatif qui s'oppose au processus de différenciation de la cellule végétale. Ceci est démontré par le fait que si l'on élimine ce mécanisme de contrôle on obtient une cellule transformée qui se différencie en une plante normale. On a ainsi pu élever une plante de tabac, provenant d'une tumeur de crown gall. Cette plante, dont la croissance est parfaitement normale et fertile, synthétise de l'octopine, et a conservé une partie du T-DNA de la cellule tumorale dont elle dérive. Nous avons étudié la descendance de cette plante et nous avons observé que la synthèse de l'octopine ségrège de façon mendélienne dans cette

descendance et que le gène octopine synthèse se comporte comme un allèle dominant.

Quatre, et peut-être six, gènes identifiés sont responsables des propriétés oncogènes du T-DNA. Ensemble ils semblent contrôler la différenciation par un système double. Les produits des gènes 1, 2, et 4 empêchent la différenciation aussi bien des cellules transformées (contenant le T-DNA) que de cellules normales non transformées. En plus, le gène 5, peut-être en collaboration avec l'activité du gène 4 inhibe la différenciation de cellules transformées seulement. Nous savons déjà que certains des produits de transcription de ces gènes sont des messagers et qu'ils sont traduits en protéines, mais nous ne connaissons pas encore leur fonction. Il faut souligner que l'activité des gènes 1 et 2 empêche spécifiquement la différenciation de tiges alors que l'activité du gène 4 empêche la différenciation de racines. En plus les gènes 1 et 2, en l'absence du gène 4, stimulent la formation de racines, tandis que l'activité du gène 4, en l'absence des gènes 1 et 2, stimule la formation de tiges. Il y a donc un double circuit de contrôle. Les gènes 1 et 2 exercent un contrôle négatif sur la formation de tiges, mais ont un effet positif sur la formation de racines. Réciproquement, le gène 4 exerce un contrôle négatif sur la formation de racines et un effet positif sur la formation de tiges. Dans les deux cas, le contrôle négatif prévaut sur l'effet positif, puisque lorsque les gènes 1, 2 et 4 sont tous actifs, on observe une suppression de formation de tiges et de racines. Ces résultats présentent un double intérêt.

1) D'une part, il montre bien que les plasmides Ti d'*agrobacterium tumefaciens* pourront être utilisés pour le génie génétique des végétaux : on est déjà parvenu, grâce à eux, à introduire des séquences d'ADN étrangères dans des cellules végétales, et l'on a pu régénérer des plantes portant ces séquences. D'autre part, l'étude des plantes à octopine régénérées à partir de tumeurs de crown gall montre que le T-DNA est intégré dans le matériel chromosomique.

2) L'étude des fonctions déterminant le caractère tumoral des cellules de crown gall montre que le T-DNA porte des gènes spécifiques qui interfèrent avec l'expression normale du génome, l'étude de ces gènes et de leur interaction avec les gènes de morphogenèse des cellules végétales apparaît comme un moyen d'aborder les problèmes de différenciation chez les plantes.

LE DÉVELOPPEMENT DU PLASMIDE Ti COMME VECTEUR EXPÉRIMENTAL

Ayant découvert que de l'interaction *Agrobacterium*/cellules végétales blessées conduit au transfert et l'intégration dans le génome des végétaux d'un segment bien défini du plasmide Ti (la région T), il était évident de se poser la question de savoir si d'autres séquences d'ADN, insérées expérimentalement dans cette région T seraient également transférées. L'analyse génétique de la région T par insertion de transposons produisant des plasmides Ti mutés permet de tester cette hypothèse. L'insertion du transposon Tn7 dans le locus de la nopaline synthase produit un plasmide Ti muté, mais néanmoins toujours capable de provoquer le transfert du T-DNA et la formation de tumeurs. L'analyse de l'ADN de ces tumeurs montre que la totalité de la région T, y compris la séquence de Tn7, est transférée et intégrée en un segment unique de 38×10^3 paires de bases.

Indéniablement, le mécanisme responsable du transfert et de l'intégration du T-DNA n'est pas déterminé, ni même influencé de manière manifeste, par les gènes ou la longueur des séquences d'ADN portés par la région T. A l'exception des séquences de reconnaissance, qui se situent normalement aux extrémités de la région T, toutes les autres séquences peuvent être remplacées par de l'ADN «étranger». Ceci explique pourquoi les plasmides Ti peuvent être aisément utilisés comme vecteurs expérimentaux dans les végétaux.

CONCEPTION RATIONNELLE DE VECTEURS GÉNÉTIQUES À PARTIR DU PLASMIDE Ti

Deux propriétés du plasmide Ti de type sauvage ont rendu son utilisation en tant que vecteur assez ardue. (i) La taille de ces plasmides est telle qu'il est difficile ou impossible de trouver des sites de restriction dans la région T uniques et adéquats pouvant être utilisés pour le clonage d'ADN étranger. Des vecteurs «intermédiaires» ont dès lors été développés. Ceux-ci contiennent une partie de la région T. Le fragment d'ADN étranger peut alors être subcloné dans ce fragment de la région T. Par recombinaison *in vivo* entre le vecteur intermédiaire et un plasmide Ti accepteur, on effectue un échange entre le fragment présent dans le plasmide Ti et le segment homologue situé sur le vecteur intermédiaire contenant le fragment d'ADN étranger. (ii) L'autre problème est que la transformation de cellules végétales par la région T du plas-

mide Ti, même si celle-ci contient des insertions d'ADN étranger, entraîne la formation de cellules tumorales, présentant des anomalies de croissance et de différenciation. Si l'on désire réutiliser ce système, il est essentiel que les cellules transformées soient normales, plutôt que tumorales. Ceci est obtenu en éliminant de la région T toutes les séquences responsables de la croissance tumorale et en conservant les gènes codant pour l'opine synthase. Des plantes normales contenant un gène fonctionnel pour l'octopine synthase ont été obtenues. Il a été démontré que ces plantes sont fertiles et que le gène introduit est transmis sexuellement comme un simple locus mendélien dominant.

Ces études montrent qu'il est possible de concevoir un plasmide Ti possédant une région T modifiée présentant les caractéristiques suivantes : des séquences bordantes ou de reconnaissance d'insertion ; pas de gènes responsables de la croissance anormale ; un gène marqueur (idéalement un gène dominant pouvant être sélectionné) permettant ainsi de mettre le transfert en évidence ; et une séquence dérivée d'un vecteur de clonage largement répandu, tel que pBR322. Une simple recombinaison *in vivo* entre un vecteur intermédiaire, comme un plasmide de pBR322 portant un gène que l'on veut transférer, et le plasmide Ti accepteur, tel que décrit plus haut, doit permettre d'introduire le vecteur intermédiaire dans la région T de ce plasmide Ti. Un tel plasmide a été construit récemment dans notre laboratoire. Ce plasmide procède très efficacement au transfert et à l'intégration d'une séquence d'ADN étranger dans des cellules végétales qui, transformées par le nouveau vecteur, sont capables de régénérer des plantes entières. On s'attend à ce que ces gènes introduits dans les plantes se transmettent sexuellement à leur descendance comme un nouveau locus chromosomique.

CONCEPTION ET CONSTRUCTION D'UN VECTEUR D'EXPRESSION INTERMÉDIAIRE POUR LA TRANSCRIPTION ET LA TRADUCTION DE GÈNES ÉTRANGERS DANS LES PLANTES

En utilisant différents types de vecteurs intermédiaires, un certain nombre de gènes de bactéries, d'animaux et de plantes ont été introduits dans des cellules de tabac ou de tournesol. En aucun cas, les gènes n'ont été correctement exprimés. D'autre part, les gènes de type sauvage du T-DNA, tel que les gènes codant pour l'octopine ou la nopaline synthase, sont exprimés dans ces plantes. Afin de comprendre

le mécanisme par lequel ces gènes sont exprimés dans les plantes, la séquence de l'ADN et la localisation précise des extrémités (3' et 5') des copies de ces gènes ont été déterminées. Bien que ces gènes se trouvent sur un plasmide d'origine bactérienne, ceux-ci présentent des caractéristiques plus typiques des eucaryotes que des procaryotes. Ils sont dès lors très utiles dans l'étude de l'expression dans les cellules végétales, d'autant plus qu'ils sont exprimés constitutivement aussi bien dans des cellules calleuses que dans tous les tissus de plantes régénérées à partir de cellules transformées par le T-DNA.

Afin d'éviter la limitation de l'expression des gènes étrangers dans les plantes, des gènes chimériques ont été construits ; ces gènes consistent en des séquences de promoteurs dérivés du gène de la nopaline synthase (*nos*) et des séquences codantes provenant de gènes étrangers, tels que la phosphotransférase de néomycine de Tn5, la réductase de déhydrofolate résistante au méthotrexate provenant du plasmide R67, ou l'acétyltransférase de chloramphenicol de pBR325. Comme modèle pour la construction de tels gènes chimériques, la séquence codant pour le gène de l'octopine synthase a été introduite à différents endroits situés en aval du promoteur de la opaline synthase. Étant donné qu'il est aisé de déterminer l'activité de l'octopine synthase, cette approche a permis de définir quel segment du promoteur du gène de la nopaline synthase est essentiel à l'expression du gène «étranger» (en l'occurrence *ocs*).

Ces gènes chimériques ont été transférés au moyen d'un vecteur intermédiaire vers des cellules de tabac et il a été démontré qu'ils sont exprimés et produisent les enzymes fonctionnels. Étant donné que des antibiotiques, tels que la kanamycine et G418, et des produits, tels que le méthotrexate, sont fortement toxiques pour les cellules végétales, l'expression de la phosphotransférase de néomycine (NPTII) et de la réductase de déhydrofolate résistante au méthotrexate (DHFR Mtx) devrait rendre ces cellules résistantes à la kanamycine et au G418, d'une part, et au méthotrexate, d'autre part. Ceci s'est effectivement avéré être le cas et nous savons maintenant que ces gènes peuvent être utilisés comme de puissants marqueurs dominants sélectionnables.

RÉFÉRENCES

- DE GREVE, H., LEEMANS, J., HERNALSTEENS, J. P., THIA-TOONG, L., DE BEUCKELEER, M., WILLMITZER, L., OTTEN, L., VAN MONTAGU, M., and SCHELL, J. (1982). Regeneration of normal and fertile plants that express octopine

- synthase, from tobacco crown galls after deletion of tumour-controlling functions. *Nature* (London), 300, 752-755.
- DHAESE, P., DE GREVE, H., GIELEN, J., SEURINCK, J., VAN MONTAGU, M., and SCHELL, J. (1983). Identification of sequences involved in the polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models. *EMBO J.* 2, 419-426.
- HERRERA-ESTRELLA, L., DEPICKER, A., VAN MONTAGU, M., and SCHELL, J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* (London), 303, 209-213.
- HERRERA-ESTRELLA, L., DE BLOCK, M., MESSENS, E., HERNALSTEENS, J.-P., VAN MONTAGU, M., and SCHELL, J. (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.*, 2, in press.
- JOOS, H., INZÉ, D., CAPLAN, A., SORMANN, M., VAN MONTAGU, M., and SCHELL, J. (1983). Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. *Cell* 32, 1057-1067.
- LEEMANS, J., DEBLAERE, R., WILLMITZER, L., DE GREVE, H., HERNALSTEENS, J. P., VAN MONTAGU, M., and SCHELL, J. (1982). Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J.* 1, 147-152.
- OTTEN, L., DE GREVE, H., HERNALSTEENS, J. P., VAN MONTAGU, M., SCHIEDER, O., STRAUB, J. and SCHELL, J. (1981). Mendelian transmission of genes introduced into plants by the TI plasmids of *agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 183, 209-213.
- SCHRÖDER, G., KLIPP, W., HILLEBRAND, A., EHRING, R., KONCZ, C., and SCHRÖDER, J. (1983). The conserved part of the T-region in Ti-plasmids expresses four proteins in bacteria. *EMBO J.* 2, 403-409.
- VAN HAUTE, E., JOOS, H., MAES, M., WARREN, G., VAN MONTAGU, M., and SCHELL, J. (1983). Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 2, 411-418.
- WILLMITZER, L., SIMONS, G., and SCHELL, J. (1982). The TL-DNA in octopine crown gall tumours codes for seven well-defined polyadenylated transcripts. *EMBO J.* 1, 139-146.
- WILLMITZER, L., DHAESE, P., SCHREIER, P. H., SCHMALENBACH, W., VAN MONTAGU, M., and SCHELL, J. (1983). Size, location, and polarity of T-DNA-encoded transcripts in nopaline crown gall tumors; evidence for common transcripts present in both octopine and nopaline tumors. *Cell* 32, 1945-1056.

Bibliographie

Le lecteur qui souhaiterait approfondir certains aspects des sujets traités dans le volume trouvera dans la liste qui suit les références de livres ou d'articles qui pourront le guider utilement à travers une littérature riche et abondante.

I. Ouvrages généraux en langue française

- CHANGEUX, J.-P. – *L'Homme neuronal*, Fayard, Paris, 1983.
- GROS, F., JACOB, F. et ROYER, P. – *Sciences de la vie et société*. Collection Points, Paris, Le Seuil, 1980.
- JACOB, F. – *Le Jeu des possibles*, Fayard, Paris, 1981.
- LWOFF, A. – *L'Ordre biologique*, Laffont, Paris, 1969.
- LWOFF, A. et ULLMANN, A. – *Origines de la biologie moléculaire*, hommage à Jacques Monod, Paris-Montréal, Edit. Etudes vivantes, 1980.
- MONOD, J. – *Le Hasard et la nécessité*, Collection Points, Le Seuil, Paris, 1973.
- DE ROSNAY, J. – *Les Origines de la vie*, Collection Points, Le Seuil, Paris, 1977.
- WATSON, J. D. – *La double hélice*, Laffont, Paris, 1968.
- WATSON, J. D. – *Biologie moléculaire du gène*, Inter Edition, Paris, 1978.
- OUVRAGE COLLECTIF. – *La Recherche en biologie moléculaire*, Collection Points, Le Seuil, Paris, 1975.

II. La synthèse des protéines (Titre 1)

- CHAPEVILLE, F. et HAENNI, A. L. – *Biosynthèse des protéines*, Herman, Paris, 1980.
- LAKE, J. A. – «The Ribosome», *Scientific American*, Aug. 1981, pp. 56-69.

III. L'évolution des protéines (Titre 2)

- Evolving genes and proteins*, eds. Bryson and Vogel, Academic Press, New York, 1965.
- Protein sequence and structure*, eds National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.
- Protides of the Biological Fluids*, vol. XXVIII, 1980.
- Synthesis, Structure, and Function of Hemoglobin*, eds. Martin and Nowicki, Lehmann's Verlag, Munich.

IV. Stabilité et évolution du DNA (Titre 3)

CAIRNS, J. – *Cancer Science and Society*, Freeman and Co., San Francisco, 1978.

L'auteur y décrit la nature des cellules cancéreuses et montre que l'apparition de tel type de tumeur est souvent liée avec le mode de vie et avec la répartition géographique de tel groupe social. Il montre l'importance des facteurs de l'environnement (produits toxiques, radiations, virus) dans la genèse des cancers.

CRICK, F. – *Life itself: its origin and nature*, McDonald and Co (London & Sidney), 1982.

L'auteur décrit nos idées actuelles sur l'origine de la vie et sur le temps qu'il a fallu pour en arriver à ce que nous voyons autour de nous. Il discute des possibilités de vie sur d'autres planètes et se demande si, depuis la formation de la terre, il s'est écoulé un temps suffisant pour permettre l'évolution prébiologique et biologique telle que nous pouvons l'imaginer. Au cas où il aurait fallu plus de 4,5 milliards d'années – depuis la formation du système solaire – il faudrait envisager que la vie serait apparue sur une «autre planète» du cosmos et aurait par la suiteensemencé notre terre. (anticipation scientifique ou science fiction ?).

DAWKINS, R. – *The selfish gene*, Oxford University Press, 1981 (1^e édition 1976).

La sélection naturelle tend à maintenir les gènes, unités d'hérédité, plutôt que l'espèce, le groupe ou même l'individu. Cette idée est défendue souvent avec humour, en interprétant dans ce sens la survie des espèces actuelles dans leurs caractères biologiques. L'idée générale est étendue aux «mèmes» qui seraient l'homologue des gènes et joueraient le rôle d'unité de l'hérédité culturelle ; ils auraient également été soumis à une sélection naturelle.

EIGEN, M., GARDNER, W., SCHUSTER, P., WINKLER, R., WATISCH, O. S. – *The origin of genetic information*, Scientific American, p. 78, avril 1981.

Les mécanismes possibles de l'apparition originelle de molécules organiques et leur évolution prébiotique est décrite. La sélection de certaines d'entre-elles et leur coopération peuvent mener à la synthèse d'une «information génétique» primitive.

HOWARD-FLANDERS, P. – «Pourquoi y a-t-il si peu de mutants?» *Pour la Science*, n° 51, p. 102, janvier 1982.

L'auteur décrit les mécanismes biochimiques de la réparation constitutive et induite (SOS) de l'ADN et les gènes bactériens qui sont impliqués.

JACOB, F. – *La logique du vivant : une histoire de l'hérédité*, Gallimard, 1970. Une histoire passionnante de la génétique.

- JACOB, F. – *Le jeu des possibles : essai sur la diversité du vivant*, Fayard, 1981.
La diversité des individus, engendrée par la reproduction sexuelle, la recombinaison entre gènes et les mutations dont ils sont le siège, est décrite comme un «bricolage» moléculaire, résultant de la réutilisation constante du vieux pour faire du neuf.
- JUDSON, A. F. – *The eighth day of creation*, London Cape, 1979.
Un historique vivant et très documenté de la biologie moléculaire rédigé à la suite de nombreuses conversations de l'auteur avec la plupart des acteurs, mais pas tous, ce qui laisse dans l'ombre quelques aspects essentiels ; mais on redécouvre la structure de l'ADN avec Watson et Crick et celle de l'hémoglobine avec Perutz et Kendrew, tellement les personnages et l'ambiance scientifique dans laquelle ils ont travaillé sont réels.
- PTASHNE, M., JOHNSON, A. D., PABO, C. O. – *Scientific American*, p. 106, novembre 1982.
Deux protéines régulatrices interagissant avec une région de l'ADN viral pour enclencher une série de gènes et en bloquer une autre en réponse à un changement de l'environnement. La commande est décrite en termes de sa structure moléculaire.
- RADMAN, M., ROMMELAERE, J., ERRERA, M. – Stability and Evolution of DNA from the point of view of Molecular Radiobiology, dans : *Physico-chemical properties of nucleic acids*. Ed. par J. Duchesne, vol. 3, Academic press, pp. 161-201, 1973.
Les auteurs examinent les problèmes de l'évolution en relation avec ce que l'on connaît des mécanismes de réparation et de recombinaison de l'ADN.
- RADMAN, M., JEGGO, P., WAGNER, R. – «Chromosomal rearrangements and carcinogenesis», *Mutation Research* 98, pp. 249-264, 1982.
Les auteurs passent en revue les arguments permettant de supposer que les réarrangements de chromosomes seraient l'une des causes, plutôt qu'une conséquence, de la cancérisation.
- SARASIN, A. – «Le cancer et la réparation de l'ADN», *La Recherche*, n° 124, 12, pp. 824-838, 1981.
Cet article décrit les relations entre lésions de l'ADN, capacité de les réparer et cancers, en se plaçant dans l'optique de la génétique des cellules humaines. Il y décrit notamment quelques maladies, heureusement rares, où une déficience héréditaire conduit presque inéluctablement au cancer.
- WITKIN, E. – «From Gainesville to Toulouse : the evolution of a model», *Biochimie* 64, pp. 549-555, 1982.
L'auteur retrace le développement de l'idée d'une réparation SOS induite de l'ADN endommagé, proposée en 1974 par Radman et discutée en

1975 au cours d'un petit colloque à Gainsville. Le congrès de Toulouse 1982 a été entièrement consacré à l'état actuel du problème.

V. Le contrôle génétique (Titre 4)

The Microbial World, Stanier, Doudouff and Adelberg, 1976.

«Phage Mu : transposition as a life-style», A. Toussaint et A. Résibois dans *Movable Genetic Elements*, ed. J. A. Shapiro, Academic Press, chapitre 3, pp. 105-158, 1982.

VI. Le génie génétique (Titre 5)

CHAMBON, P. – «Spliced genes», *Scientific American* 244, 60-71 (1981).

Après avoir rappelé l'évolution de la notion de gène, P. CHAMBON relate une des plus grandes découvertes de ces dernières années : la plupart des gènes des organismes supérieurs sont morcelés. Le DNA codant pour une protéine comporte des séquences non codantes dont les produits de transcription sont excisés pour aboutir au RNA messager qui sera traduit en protéines.

K. J. DENNISTON & L. W. ENQUIST. – «Recombinant DNA», Dowden, Hutchinson & Ross Inc. Benchmark Papers in *Microbiology* V. 15, 1981.

L. GROSSMAN & K. MOLDAVE. – «Methods in Enzymology». Vol. 65, part. I. Academic Press (1980).

Ce volume, ainsi que le n° 68 de «Methods in Enzymology» peuvent être considérés comme les manuels de base indispensables à tout biologiste pratiquant les techniques de génie génétique.

KOURILSKY, P. – «Le Génie Génétique», *La Recherche* 110, pp. 390-492, Vol. 11, 1980.

Revue extrêmement complète décrivant le pourquoi et le comment de l'explosion du génie génétique.

DE ROSNAY, J. – «Biotechnologies et Bio-Industrie», Seuil/La Documentation Française, 1979.

Dans le cadre du rapport *Sciences de la vie et Société* des professeurs François Gros, François Jacob et Pierre Royer, Joël de Rosnay a rédigé un document complémentaire faisant le point sur les méthodes et les techniques utilisées dans le monde, dans le domaine de la bio-industrie. Ce livre, publié en 1979, décrit particulièrement la situation en France à cette époque dans le domaine des biotechnologies.

SETLOW, J. L. & HOLLAENDER, A. – «Genetic Engineering, Principles & Methods», Vol. 1, Plenum Press, 1979.

SETLOW, J. K. & HOLLAENDER, A. – «Genetic Engineering, Principles & Methods», Vol. 2, Plenum Press, 1980.

Sélection d'articles relatifs à toutes les nouvelles techniques du génie génétique utilisées dans des domaines très variés de la biologie moléculaire.

WILLIAMSON, R. – «Genetic Engineering», Vol. 1, Academic Press, 1981.

WILLIAMSON, R. – «Genetic Engineering», Vol. 2, Academic Press, 1981.

Petits livres contenant un nombre limité de revues techniques de très grande qualité, revues qui devraient être lues par tout généticien.

WU, R. – «Methods in Enzymology», Vol. 68, Recombinant DNA, Academic Press, 1979.

VII. Les antigènes de surface (Titre 6)

VICKERMAN, K. – «Antigenic variation in trypanosomes», *Nature* 273, pp. 613-617, 1978.

CROSS, G. A. M. – «Immunochemical aspects of antigenic variation in trypanosomes», *J. of Gen. Microbiol.* 113, pp. 1-11, 1979.

BERNARDS, A. – «Transposable genes for surface glycoproteins in trypanosomes», *Trends in Biochemical Sciences* 7, pp. 253-255, 1982.

VIII. Les membranes cellulaires (Titre 7)

SABATINI, KREIBICH, MORIMOTO, ADESNIK. – «Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles», *Journal of Cell Biology*, 92, pp. 1-22, 1982.

Il s'agit d'une revue très objective sur l'ensemble des travaux concernant les interactions des protéines avec la double couche lipidique des membranes peri-et endocellulaires. Bonne analyse de dix années de recherches où se sont illustrés Singer, Tanford, Blobel, Wickner et bien d'autres, grâce à l'emploi fréquent de modèles artificiels de membranes lipidiques.

IX. L'immunologie (Titre 8).

FOUGEREAU, M. – *L'immunologie*, «Que sais-je ?», P.U.F.

FOUGEREAU et DAUSSET, J. – *Immunology*, Academic Press, 1980.

CUNNINGHAM, A. – *Understanding Immunology*, Acad. Press, 1980.

URBAIN, J. and WUILMART, C. – *Immunology Today*, vol. 3, n° 4, pp. 88-92, 1982.

URBAIN, J. – *La Recherche*, Octobre, 1981.

X. L'embryologie moléculaire (Titre 9).

La vie créatrice des formes et des fonctions (Albert Brachet, titre d'un discours rectoral et d'un livre publié en 1927).

BRACHET, J. – *Introduction to molecular Embryology*. Springer Verlag, N.Y., Heidelberg, Berlin, 176 pp., 1974.

Ouvrage de vulgarisation destiné surtout aux biologistes, médecins, étudiants intéressés à la Biologie moléculaire et à l'Embryologie. Ce livre, qui a été traduit en italien, japonais et espagnol, fera prochainement l'objet d'une seconde édition.

BRACHET, J. – *Introduction à l'Embryologie moléculaire*. Masson, Paris, 197 pp., 1974.

Cette version en français du livre précédant s'adresse à des étudiants plus avancés (3^e cycle français).

DAVIDSON, E. – *Gene activity in early development*. (2^e édition, 1976), Academic Press N.Y.

Un traité d'Embryologie moléculaire écrit par l'un des principaux spécialistes dans ce domaine.

JACOB, F. – *Le jeu des possibles*. Editions Fayard, 1981.

Les réflexions d'un très grand biologiste (Prix Nobel, Dr. h.c. de l'ULB) sur la Génétique et l'Embryologie, et surtout l'Evolution.

XI. La biologie du vieillissement (Titre 10).

LAMB, M. J. – *Biology of ageing*, Glasgow and London, Ed. Blackie (collection «Tertiary level Biology»), 184 pp., 1977.

L'auteur présente de manière concise et claire les principales données scientifiques acquises sur le vieillissement, à tous les niveaux : individus, populations, espèces, tissus, cellules, molécules.

FINCH, C. E. and HAYFLICK, L., éditeurs scientifiques. – *Handbook of the biology of Aging*, New York, Ed. Nostrand Reinhold Cy, 771 pp., 1977.

Les 27 chapitres de ce gros traité sont rédigés par des spécialistes des différents aspects de la biologie du vieillissement, allant des niveaux moléculaires et génétiques aux maladies associées à la sénescence.

XII. Les rythmes biologiques (Titre 11)

BÜNNING, E. – *Die Physiologische Uhr*, Springer 1980 (nouvelle édition) ou *The physiological Clock*, Springer 1967 (2^e édition).

Manuel sur les rythmes biologiques considérés comme une fonction physiologique et leurs propriétés, tant chez les animaux (et l'homme) que chez les végétaux.

REINBERG, A. et GHATA, J. – *Les rythmes biologiques*, Presses Universitaires de France, 3^e ed., 1978.

REINBERG, A. and HALBERG, F. (éditeurs). – *Chronopharmacology*, Pergamon Press, 1979.

Recueil des travaux originaux qui ont été présentés lors du Congrès centré sur l'optimisation des traitements et les effets cellulaires dépendant du temps de diverses substances.

VANDEN DRIESSCHE, Th. – «Circadian rythmicity : general properties – as exemplified mainly by *Acetabularia* – and hypotheses on its cellular mechanism», *Arch. de Biologie* 91, pp. 49-76, 1980.

Article qui fait le point des recherches concernant le mécanisme de la rythmicité circadienne.

XIII. **Cancer et différenciation cellulaire** (Titre 12).

1. *La Recherche*. – Vol. 10, pp. 1271-1272, n° 106, décembre 1979.

L'intitulé de cet article : (la «normalisation» des cellules cancéreuses) est une formulation explicite de l'intérêt que revêt l'étude de modèles, tels que celui de la leucémie de Friend et des tératocarcinomes, pour la compréhension des relations entre cancer et différenciation cellulaire.

2. *Sciences de la vie et société*. – La documentation française, Paris 1979 et Editions du Seuil.

Ce rapport, rédigé par F. GROS, F. JACOB, et P. ROYER à l'intention du Président de la République française, résume les connaissances actuelles dans les Sciences de la vie et les développements technologiques que l'on est en droit d'attendre de la biologie dans les domaines de la médecine, de l'agriculture et de l'écologie. La première partie de cet ouvrage, intitulée «Biologie de base», comprend un premier chapitre (pp. 27-36) consacré à la biologie de la cellule et ses constituants (dont les membranes pp. 34-36) et un second de biologie de l'organisme, traitant notamment des hormones (pp. 47-51).

XIV. **La génétique de la détermination** (Titre 13).

LEWIS, E. B. – «A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*», *Nature*, vol. 276, pp. 565-570, 1978.

Les concepts exposés dans ce chapitre à propos de la détermination segmentaire étant radicalement nouveaux, on ne peut guère se référer qu'aux articles originaux, malheureusement difficiles à comprendre par le non-spécialiste. L'article mentionné ci-dessus est certainement le plus important d'entre eux, et malheureusement aussi le plus difficile à lire.

GARCIA, A.-BELLIDO, P. A., LAWRENCE, G., MORATA. – «Compartments in animal development», *Scientific American*, vol. 241, pp. 90-98, juillet 1979.

Excellent article général sur les compartiments, écrit par les principaux artisans de leur mise en évidence, et relativement facile à lire.

XV. Le développement du système nerveux (Titre 14).

GAZE, R. M. – *The formation of nerve connections*, Academic Press, 1970.

Ce livre reste un ouvrage de référence dans le domaine du développement des connections nerveuses. Malheureusement, il est strictement limité aux vertébrés. Le seul insecte qu'on y trouve représenté est, en couverture, une mouche sur le point d'être gobée par une grenouille. Cette limitation traduit bien le fait que les apports principaux de l'étude du développement chez les insectes datent de la dernière décennie.

WIGGLESWORTH, V. B. – *The principles of insect physiology*, Chapman and Hall, 7th edition, 1972.

Excellente introduction à la physiologie des insectes par un chercheur éminent. Voir en particulier les chapitres V, VI et VII sur le système nerveux central et le système sensoriel.

DETHIER, V. G. – *To know a fly*, Holden-Day, 1962.

Ouvrage extrêmement agréable à lire, où l'humour se joint à la rigueur scientifique : mieux qu'aucun autre, ce livre permet au lecteur sans aucune formation biologique ou même scientifique de suivre, voire de partager, la démarche mi-intuitive mi-rationnelle d'un chercheur réputé.

XVI. La logique de la régulation (Titre 15).

Kinetic logic – «A boolean approach to the Analysis of Complex Regulatory Systems» (*Lecture notes in Biomathematics*), vol. 29, R. Thomas, editor, Springer Verlag, 1979.

«Logical description, analysis and synthesis of biological and other networks comprising feedback loops», *Adv. Chem. Phys.*, 1983 (sous presse).

XVII. Génie génétique

KAHL, G. and SCHELL, J. – *Molecular Biology of Plant Tumors*, New York, Academic Press, pp. 615, 1982.

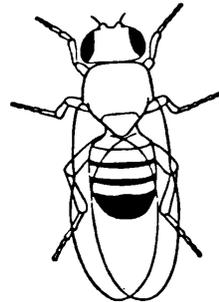
PANOPOULOS, N. J. – *Genetic engineering in the plant sciences*, New York, Praeger Publishers, pp. 271, 1981.

SCHELL, J. – «The Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*», in : *Nucleic acids and Proteins in Plants II*, B. Parthier and D. Boulter, (Encyclopedia

of Plant Physiology, New Series, Vol. 14B), Berlin, Springer-Verlag, pp. 455-474, 1982.

SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., HOLSTERS, M., HERNALSTEENS, J.-P., LEEMANS, J., DE GREVE, H., WILLMITZER, L., OTTEN, L., SCHRÖDER, J. and SHAW, C. – «The development of host vectors for directed gene transfers in plants», in : *Developmental Biology using Purified Genes*, D. Brown and C. F. Fox (Eds), (ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Vol. XXIII). New York, Academic Press, pp. 557-575, 1981.

SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., HOLSTERS, M., ZAMBRYSKI, P., JOOS, H., INZÉ, D., HERRERA-ESTRELLA, L., DEPICKER, A., DE BLOCK, M., CAPLAN, A., DHAESE, P., VAN HAUTE, E., HERNALSTEENS, J.-P., DE GREVE, H., LEEMANS, J., DEBLAERE, R., WILLMITZER, L., SCHRÖDER, J. and OTTEN, L. – «Ti plasmids as experimental gene vectors for plants», in : *Advances in Gene Technology : Molecular Genetics of Plants and Animals*, Ahmad, F., Downey, K., Schultz, J. and Voellmy, R. W. (Eds), (Miami Winter Symposia, Vol. 20). New York, Academic Press, sous presse.



Sommaire

	L'idée de la biologie moléculaire par Hubert Chantrenne	9
	**	
Titre I	La formation des protéines par Hubert Chantrenne	37
Titre II	Quelques aspects de l'évolution moléculaire des peptides primitifs aux familles multigéniques par C. Wuilmart, P. Delhaise et J. Urbain	47
Titre III	Stabilité et variabilité de l'information génétique par Maurice Errera	63
Titre IV	Recherches sur le contrôle génétique de l'expression, de la réplication et de la recombinaison par René Thomas	117
Titre V	Génie génétique : bilan et perspectives par Jean-Pierre Lecocq	137
Titre VI	Organisation et expression des génomes nucléaire et mitochondrial des trypanosomides par M. Laurent, M. Lheureux, E. Pays, M. Steinert et S. Van Assel	147
Titre VII	Relations entre la conformation spatiale des immunoglobulines γ et leur interaction avec les chaînes acylées des lipides membranaires par Raymond Jeener	163
Titre VIII	Le système immunitaire, la diversité des anticorps et le réseau idiotypique par Jacques Urbain	169
Titre IX	Le prélude à la morphogenèse : un exemple de l'unité et de la diversité du vivant par Jean Brachet	193
Titre X	Le vieillissement cellulaire en culture et dans les animaux par Paulette Van Gansen	243
Titre XI	L'organisation du temps biologique : les cycles de 24 heures et leur rôle probable dans la différenciation par Thérèse Vanden Driessche	263
Titre XII	Changements membranaires associés à la différenciation de cellules leucémiques en culture par R. Kram, M. Guyaux, H. Schmitt, Y. Goldberg et M. Rivière	289
Titre XIII	La génétique de la détermination par Christine Dambly-Chaudière et Alain Ghysen	299

Titre XIV	Le cablage du système nerveux par A. Ghysen, P. Vandervorst, E. Teugels et R. Janson	325
Titre XV	Du virus au mammifère : la logique de la régulation par René Thomas	353
	**	
	Du génie génétique naturel au génie génétique expérimental par Jozef Schell et Marc Van Montagu	381
	**	
	Bibliographie	395

de la molécule au mammifère

acquis récents et perspectives
en biologie moléculaire

évolution moléculaire

génétique

immunologie

embryologie

chronobiologie

Qui aurait cru il y a vingt ans qu'on pourrait fusionner une cellule d'homme et une cellule de souris et en tirer une lignée cellulaire ?

Qui aurait cru que cette découverte allait permettre la localisation des gènes humains sur les chromosomes ?

Qui aurait cru il y a dix ans qu'on pourrait introduire des gènes humains dans les bactéries et leur faire produire de l'insuline ou de l'hémoglobine humaine ?

Au travers des études de biologistes et de biochimistes, ce volume tente de dégager les perspectives d'une science en essor continu et dont les retombées touchent nécessairement tout ce qui vit.

Règles d'utilisation de copies numériques d'œuvres littéraires publiées par l'Université libre de Bruxelles et mises à disposition par les Archives & Bibliothèques de l'ULB

L'usage des copies numériques d'œuvres littéraires, ci-après dénommées « copies numériques », publiées par l'Université Libre de Bruxelles, ci-après ULB, et mises à disposition par les Archives & Bibliothèques de l'ULB, ci-après A&B, implique un certain nombre de règles de bonne conduite, précisées ici. Celles-ci sont reproduites sur la dernière page de chaque copie numérique mise en ligne par les A&B. Elles s'articulent selon les trois axes : protection, utilisation et reproduction.

Protection

1. Droits d'auteur

La première page de chaque copie numérique indique les droits d'auteur d'application sur l'œuvre littéraire.

2. Responsabilité

Malgré les efforts consentis pour garantir les meilleures qualité et accessibilité des copies numériques, certaines déficiences peuvent y subsister – telles, mais non limitées à, des incomplétudes, des erreurs dans les fichiers, un défaut empêchant l'accès au document, etc. -. Les A&B déclinent toute responsabilité concernant les dommages, coûts et dépenses, y compris des honoraires légaux, entraînés par l'accès et/ou l'utilisation des copies numériques. De plus, les A&B ne pourront être mises en cause dans l'exploitation subséquente des copies numériques ; et la dénomination des 'Archives & Bibliothèques de l'ULB' et de l'ULB, ne pourra être ni utilisée, ni ternie, au prétexte d'utiliser des copies numériques mises à disposition par eux.

3. Localisation

Chaque copie numérique dispose d'un URL (uniform resource locator) stable de la forme <http://digistore.bib.ulb.ac.be/annee/nom_du_fichier.pdf> qui permet d'accéder au document ; l'adresse physique ou logique des fichiers étant elle sujette à modifications sans préavis. Les A&B encouragent les utilisateurs à utiliser cet URL lorsqu'ils souhaitent faire référence à une copie numérique.

Utilisation

4. Gratuité

Les A&B mettent gratuitement à la disposition du public les copies numériques d'œuvres littéraires publiées par l'ULB : aucune rémunération ne peut être réclamée par des tiers ni pour leur consultation, ni au prétexte du droit d'auteur.

5. Buts poursuivis

Les copies numériques peuvent être utilisés à des fins de recherche, d'enseignement ou à usage privé. Quiconque souhaitant utiliser les copies numériques à d'autres fins et/ou les distribuer contre rémunération est tenu d'en demander l'autorisation aux Archives & Bibliothèques de l'ULB, en joignant à sa requête, l'auteur, le titre, et l'éditeur du (ou des) document(s) concerné(s).

Demande à adresser au Directeur de la Bibliothèque électronique et Collections Spéciales, Archives & Bibliothèques CP 180, Université Libre de Bruxelles, Avenue Franklin Roosevelt 50, B-1050 Bruxelles.
Courriel : bibdir@ulb.ac.be.

6. Citation

Pour toutes les utilisations autorisées, l'utilisateur s'engage à citer dans son travail, les documents utilisés, par la mention « Université Libre de Bruxelles – Archives & Bibliothèques » accompagnée des précisions indispensables à l'identification des documents (auteur, titre, date et lieu d'édition).

7. Liens profonds

Les liens profonds, donnant directement accès à une copie numérique particulière, sont autorisés si les conditions suivantes sont respectées :

- a) les sites pointant vers ces documents doivent clairement informer leurs utilisateurs qu'ils y ont accès via le site web des Archives & Bibliothèques de l'ULB ;
- b) l'utilisateur, cliquant un de ces liens profonds, devra voir le document s'ouvrir dans une nouvelle fenêtre ; cette action pourra être accompagnée de l'avertissement 'Vous accédez à un document du site web des Archives & Bibliothèques de l'ULB'.

Reproduction

8. Sous format électronique

Pour toutes les utilisations autorisées mentionnées dans ce règlement le téléchargement, la copie et le stockage des copies numériques sont permis ; à l'exception du dépôt dans une autre *base de données*, qui est interdit.

9. Sur support papier

Pour toutes les utilisations autorisées mentionnées dans ce règlement les fac-similés exacts, les impressions et les photocopies, ainsi que le copié/collé (lorsque le document est au format texte) sont permis.

10. Références

Quel que soit le support de reproduction, la suppression des références à l'ULB et aux Archives & Bibliothèques de l'ULB dans les copies numériques est interdite.