Pourquoi, comment nous vieillissons. Le modèle des insectes en colonies. Le vieillissement est une constante des espèces vivantes. Il est aussi un problème. Si on voulait l'éviter, il faudrait d'abord l'expliquer ! Si l'organisme fonctionne bien étant jeune, pourquoi les pannes de ce fonctionnement ? La sélection naturelle devrait, au contraire, favoriser une longévité accrue. L'explication de la sénescence est-elle purement mécanique, par des lésions au niveau de l'ADN, des cellules, des tissus, des organes ? Il y aurait dans ce cas une relation inverse entre taux de sénescence et activité métabolique. Faut-il faire intervenir des conditions d'environnement ? La longévité serait alors évolutive, elle se serait adaptée aux conditions de l'existence, à l'âge de la fécondité, aux risques de mortalité. Une étude récente a étudié ce phénomène chez les insectes dit « eusociables », c'est-à-dire ceux dont les fonctions dans une colonie sont partagées : termites, fourmis, abeilles [1]. Chez ces dernières, on constate que les animaux reproducteurs, les reines, ont une durée de vie environ cent fois supérieure à celle des ouvrières (10 ans contre 0,1 an). Or leur potentiel reproductif n'est atteint que tard, quand la colonie a atteint une taille définie, il augmente avec l'âge, les reines vivant alors dans des colonies défendues contre les prédateurs où leurs risques de mortalité sont faibles. Les fourmis, elles, ont des stratégies variées de reproduction, une ou plusieurs reines, ce qui modifie aussi les stratégies de fondation des nids. Les reines des espèces monogynes fondent les nouvelles colonies seules, celles des espèces polygynes restent, ou retournent, dans des colonies existantes. Le risque est donc majeur qu'une colonie perde une reine unique ; la polygynie sera choisie quand les nids sont mal protégés, ou que les changements d'environnement, et leurs risques de mortalité, imposent des déplacements. La reproduction par les reines y est aussi plus précoce. Dans ce cas, comme dans celui des abeilles, l'hypothèse « mécanique » n'est pas conforme aux faits : le métabolisme d'une reine, dont le poids des œufs peut dépasser chaque jour son propre poids, n'est sûrement pas inférieur à celui d'une ouvrière. En revanche, on constate une durée de vie des reines monogynes supérieure à celle des polygynes (12,5 contre 1,6 an) et une corrélation significative entre durée de vie, nombre de reines et mode de fondation des colonies. Pourrait-on constater cette même relation dans des espèces éloignées ? Les oiseaux, les chauves-souris, à l'abri des prédateurs terrestres, ont une durée de vie supérieure à celle des mammifères de même taille vivant au sol. Il en est de même pour la tortue protégée par sa coquille. Chez les taupes, seuls mammifères partageant les rôles de manière « eusociable », la reine a une longévité accrue. Il est manifestement plus avantageux d'être reine qu'ouvrière ! L'explication de ces observations ne peut être, à ce jour, que spéculative. On peut supposer qu'une espèce dont les reproductrices sont en permanence menacées ne peut s'adapter qu'en augmentant la précocité de la fécondité, alors qu'en revanche, une augmentation de la limite génétique de la longévité, dont elles n'auraient pas l'occasion de profiter, n'a aucun intérêt dans une perspective évolutive. En revanche, une espèce dont les femelles sont bien protégées peut se permettre de sélectionner une stratégie de reproduction tardive, associée alors obligatoirement à une augmentation de longévité. Quant aux hommes... Quand nous vivrons « Le meilleur des mondes », peut-être les alpha plus survivront-ils aux epsilon et même aux delta ! Nous ne souhaitons pas que ce soit pour demain.

[1. Keller L, Genoud M. *Nature* 1997 ; 389 : 958-60.]

Implication d'*IGF2* dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann et la régulation de l'empreinte parentale. Les enfants souffrant du syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) présentent, entre autres, une hypertrophie de différents organes (langue, reins, foie...), des tumeurs (reins, surrénales), et des hypoglycémies. Le gène *IGF2 (insulin-like growth factor 2),* situé sur le chromosome 11p15 chez l'homme, est soumis à empreinte parentale et seul l'allèle paternel est exprimé *(m/s n° 10, vol. 11, p. 1493).* Dans la grande majorité des patients atteints du BWS, le gène maternel est aussi exprimé (perte d'empreinte) [1]. Cependant les anomalies génétiques observées chez ces patients ne touchent pas que l'*IGF2* et peuvent aussi altérer les gènes *H19* ou $p57^{Kip2}$ qui sont proches *(m/s n° 5, vol. 13, p. 716).* Le lien entre surexpression d'*IGF2* et manifestations du BWS n'était jusqu'alors pas formellement démontré. De grandes difficultés avaient été rencontrées pour produire des souris transgéniques surexprimant *IGF2* durant le développement. Fang-Lin Sun *et al.* du Babraham Institute à Cambridge (GB) ont contourné cette difficulté en réalisant des animaux transgéniques chimères avec des cellules souches embryonnaires de souris ayant intégré un transgène d'IGF2 [2]. Ces souris présentent de nombreuses caractéristiques du BWS : croissance *in utero* excessive, hypertrophie des reins, de la langue, anomalies du squelette... Le degré d'atteinte, en particulier l'hypertrophie des organes, est corrélé au taux de surexpression d'*IGF2* dans les tissus atteints. Les concentrations plasmatiques d'IGF2 sont aussi augmentées. En revanche, l'expression des gènes *H19* et $p57^{Kip2}$ n'est pas ou peu modifiée. La surprise vient de la mise en évidence de la perte de l'expression du transgène dans les cellules différenciées. Alors que le gène endogène et le transgène sont tous deux exprimés dans les cellules embryonnaires indifférenciées, seul le gène endogène est exprimé dans les cellules différenciées. La surexpression d'*IGF2* chez ces souris est donc liée à celle du gène endogène. Cela s'expliquerait par une hyperméthy-

lation de la région DMR2 *(differentially methylated region)* du seul gène endogène dans les cellules différenciées (à la différence des cellules indifférenciées dans lesquelles le transgène est aussi méthylé). La méthylation du gène endogène touchant plus de 50 % de ce dernier, le gène maternel serait aussi méthylé. Le mécanisme de ces modifications épigénétiques acquises au cours du développement reste encore spéculatif: (1) compétition pour des éléments inhibiteurs se liant éventuellement à DMR2 et limitant sa méthylation, ou (2) modifications permanentes de la méthylation du gène *IGF2* induite par l'expression transitoire du transgène au cours du développement. Fang-Lin Sun *et al.* penchent manifestement plutôt pour la première hypothèse, ce qui conduirait à spéculer sur l'existence d'un inhibiteur d'*IGF2* pouvant à son tour être le siège d'anomalies moléculaires dans le BWS…

[1. Forné T, Feil R. *Med Sci* 1997; 13: 711-5.]
[2. Fang-Lin Sun, *et al. Nature* 1997; 389: 809-15.]

Modulations des empreintes parentales. Il existe sur le chromosome 11 humain deux régions soumises à empreinte parentale [1], en 11p15.5 et en 11p13. Dans la région 11p15.5, le double rôle du gène *KVLQT1* a créé récemment la surprise et confirmé, si besoin était, la grande subtilité des mécanismes d'empreinte parentale. En effet, alors qu'il code pour un canal potassique sans être soumis à empreinte *(m/s n° 5, vol. 13, p. 718),* il agit aussi comme « boîte à empreinte » dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann pour les gènes de la région (*m/s n° 5, vol. 13, p. 716).* Une équipe japonaise vient de montrer que la région 11p13 n'est pas, elle non plus, dénuée d'intérêt [2]. Le gène *WT1,* codant pour une protéine à doigt de zinc qui joue, entre autres, un rôle de répresseur transcriptionnel, est impliqué dans un cancer du rein chez l'enfant: la tumeur de Wilms [3]. Mais le moins qu'on puisse dire est que l'empreinte à laquelle ce gène est soumis n'est pas univoque. Au cours du développement embryonnaire, les allèles paternels et maternels sont exprimés dans les reins et le tractus urogénital. Mais, dans le cerveau fœtal et le placenta, seul l'allèle maternel est exprimé. En revanche, seul l'allèle paternel est exprimé dans les fibroblastes et les lymphocytes de certains sujets, tandis que, chez d'autres individus, l'expression est bi-allélique ou uniquement maternelle. Cette variation n'est pas sans rappeler le mécanisme de l'inactivation de l'X. L'absence apparente d'empreinte parentale dans le rein pourrait correspondre à une distribution au hasard à l'échelon cellulaire d'une inactivation, tantôt du *WT1* paternel, tantôt du *WT1* maternel. L'hypothèse de gènes modificateurs d'empreinte, déjà suggérée par le polymorphisme du gène *IGF2,* [4] devrait être recherchée. Ces travaux préliminaires méritent confirmation mais démontrent une fois de plus que nous avons encore beaucoup à apprendre sur les mécanismes d'empreinte parentale.

[1. Dreyfus J. *Med Sci* 1994; 10: 1006-10.]
[2. Mitsuya K, *et al. Hum Mol Genet* 1997; 6 : 2243-6.]
[3. Junien C. *Med Sci* 1990; 6: 464-9.]
[4. Giannoukakis N, *et al. Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 1014-9.]

Où il est encore question du gène *XIST*. Tant que l'inactivation au hasard des X ne sera pas complètement comprise, *médecine/sciences* se devra de distiller à ses lecteurs les minuscules et continuels progrès publiés dans ce domaine *(m/s n° 5, vol. 13, p. 723 et n° 6/7, vol. 13, p. 912).* Le caractère stochastique de cette inactivation dans les lignées embryonnaires des cellules somatiques aboutissant, par un mécanisme en deux étapes, à deux populations cellulaires approximativement équivalentes (selon que l'X paternel (Xp) ou l'X maternel (Xm) aura été inactivé) étant admis, on reste toujours à la recherche, chez les humains, de facteur(s) régissant le choix de l'X actif. Aussi, l'étude des embryons humains issus de fécondations *in vitro* (FIV) et d'injections intracytoplasmiques de spermatozoïdes (ICSI), avec la mise au point de techniques de génétique moléculaire portant sur une seule cellule, en vue de diagnostics préimplantatoires, est-elle précieuse car elle permet d'explorer le mode d'expression du *XIST* dans l'ovocyte, le zygote et les premiers stades de développement embryonnaire chez l'homme et de le comparer aux résultats obtenus jusqu'alors chez la souris. Afin d'étudier le fonctionnement du gène *XIST* humain, un groupe anglais a donc recueilli des embryons humains provenant de FIV et d'ICSI qui n'avaient pu être réimplantés ainsi que des ovocytes [1]. Au stade 4-8 cellules, l'expression de *XIST* fut détectée, non seulement dans les cellules isolées des embryons féminins, ce qui était attendu, mais aussi dans les cellules des embryons masculins. Autre surprise: l'expression de *XIST* se révéla plus précoce que celle de *Xist* chez la souris. Elle fut retrouvée au stade 2-4 cellules et, plus tôt encore, dans des ovocytes fécondés sans début de clivage, et alors même qu'il s'agissait de zygotes mâles. Que représente l'expression du *XIST* maternel dans des cellules d'embryons mâles? A ce stade indifférencié, les cellules se comporteraient-elles comme les cellules ES murines avec expression faible du *Xist* du seul X des cellules mâles et des deux X actifs des cellules femelles? Les travaux d'un autre groupe anglais se consacrant essentiellement à l'étude de l'inactivation de l'X viennent renforcer la probabilité de cette hypothèse [2].

En hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), à l'aide de sondes marquées de couleur différente, l'une pour l'ARN de *Xist*, l'autre pour le transcrit de *Pgk-1*, on constate que le profil d'expression de *Xist* dans des cellules XX d'embryons de souris (stade post-implantatoire) et celui des cellules ES entreprenant une différenciation est très voisin. On assiste très probablement ici au premier stade du processus d'inactivation. L'ARN de *Xist* est d'abord présent sous forme d'un point sur chacun des deux X. Puis, dans les cellules en voie de différenciation, alors que *Pgk-1* est encore exprimé par les deux allèles, le signal ARN de *Xist* s'étend sous forme d'un halo autour de l'X qui va devenir inactif. La diffusion n'atteint son maximum que vers le sixième jour tandis que le signal ponctuel de l'autre *Xist* se maintient. Par quel mécanisme l'état d'équilibre se produit-il ensuite ? On recherche le (ou les) facteur(s) déstabilisant(s) qui interviendraient pour garder instable un seul des deux allèles. Il agirait, soit par liaison directe à l'ARN du *Xist*, soit en empêchant cet ARN de s'associer au chromosome X. A moins qu'il n'existe deux types de transcrits, stable et instable ? La recherche, on le voit, n'est donc pas terminée, d'autant qu'il nous manque encore l'étape ultime, celle qui finit par réduire au silence ce *Xist* de l'X actif qui continue à s'exprimer alors qu'on le croyait déjà éteint à ce stade.

[1. Daniels R, *et al. Am J Hum Genet* 1997 ; 61 : 33-9.]
[2. Sheardown SA, *et al. Cell* 1997 ; 91 : 99-107.]

Pathologie de la ligne médiane : le premier gène humain. Le syndrome d'Opitz, jadis appelé syndrome BBB ou G syndrome, est génétiquement hétérogène *(m/s n° 3, vol. 12, p. 416)* et les troubles qui le caractérisent : hypertélorisme, fente labio-palatine, hypospadias, sont très évocateurs d'une anomalie de la ligne médiane, à type d'expansion de celle-ci. Ces signes sont associés à un retard mental. Grâce essentiellement à une famille dans laquelle l'inversion de l'X : inv(X) (p22.3q36), ségrégeait avec la maladie, le gène situé sur le chromosome X, en p22.3, vient d'être cloné [1]. A l'instar d'autres morphogènes [2] et *(m/s n° 3, vol. 13, p. 402)*, ce gène, baptisé *MID1* (premier gène codant pour la ligne médiane), code pour un facteur de transcription. Il s'agit d'une protéine à doigt de zinc, différente des GLI [3, 4], avec un motif tripartite qui caractérise la famille des protéines à boîtes B parmi lesquelles on trouve des régulateurs transcriptionnels intervenant très tôt au cours du développement (chez le xénope par exemple). De fait, *MID1* est exprimé de façon ubiquitaire et, chez l'embryon de souris, *Mid1* est transcrit à un stade précoce. Des mutations ont déjà été trouvées chez certains malades (délétion, mutation ponctuelle, duplications) et il y a tout lieu de penser que ce gène est le seul impliqué dans le syndrome d'Opitz à transmission liée à l'X. Reste à trouver l'autre gène sur le chromosome 22, à comprendre l'ensemble du mécanisme de régulation de la ligne médiane, et aussi à expliquer le rôle de *MID1* dans le retard mental.

[1. Quaderi N, *et al. Nat Genet* 1997 ; 17 : 285-91.]
[2. Concordet J. *Med Sci* 1996 ; 12 : 192-6.]
[3. Lacombe D. *Med Sci* 1996 ; 12 : 825-30.]
[4. Biesecker L. *Nat Genet* 1997 ; 17 : 259-60.]

Le doigt de Dieu. Nous avons déjà rapporté dans ces colonnes le rôle joué par l'homéogène *Hoxa-13* dans la formation des doigts [1] puisqu'une mutation de ce gène chez la souris (souris *Hd*) est responsable d'une hypodactylie et, chez l'homme, du syndrome HFG *(hand-foot-genital)* associant des doigts hypoplasiques et une malformation utérine (utérus bicorne ou didelphe) *(m/s n° 5, vol. 13, p. 725)*. On pouvait donc s'attendre à ce que l'association de l'allèle *Hd* avec une inactivation partielle ou complète du complexe *HoxD* (gène *Hoxd-13 seul* ou mutation complète des trois gènes 11, 12 et 13 du complexe D, $HoxD^{Del}$), entraînât une réduction de la taille des doigts ; en revanche, que cette modification s'accompagnât d'une réduction proportionnelle de la taille d'un autre membre, l'ébauche génitale, méritait quelques commentaires... En effet, les animaux *Hd/Hd* ; hétérozygotes pour la délétion $HoxD^{Del}$ présentent une réduction sévère de l'éminence génitale, et les animaux *Hd/Hd* ; $Hoxd13^{-/-}$ ont une agénésie complète de l'ébauche génitale associée à une absence de vessie et d'urètre [2]. Cette mutation est létale avant le seizième jour de vie embryonnaire, comme l'est d'ailleurs presque constamment la mutation *Hd* à l'état homozygote. On peut donc, à bon escient, classer pénis ou clitoris, au même titre que les doigts, comme l'une des extrémités corporelles mais, ce que suggère surtout l'équipe de Denis Duboule, c'est une histoire phylogénétique commune entre doigts et appareil génital externe. Savoir si ces deux éléments corporels sont nés d'une même modification régulatrice au cours de l'évolution des espèces, lors de l'adaptation nécessaire au milieu terrestre, ou si ces modifications moléculaires sont intervenues pour adapter d'abord la reproduction puis la locomotion, ou l'inverse, c'est encore une autre histoire...

[1. Duboule D, Sordino P. *Med Sci* 1996 ; 12 : 147-54.]
[2. Kondo T, *et al. Nature* 1997 ; 390 : 29.]

La protéine GFP et le suivi d'expression d'un gène au cours du développement chez l'animal vivant. L'utilisation d'animaux transgéniques a été un immense progrès dans les études de régulation, puisqu'elle a permis de suivre *in vivo* l'expression des gènes. Elle a cependant des limites. L'étude d'un promoteur nécessite un gène rapporteur, et, par conséquent, le plus souvent, l'utilisation d'un substrat permettant de localiser son expression, par hybridation *in situ* ou histochimie. Il reste difficile aussi de localiser l'expression d'un transgène chez l'animal vivant et, de ce fait, d'en suivre l'expression au cours du développement. Un travail récent d'une équipe d'Augusta (GA, USA) présente une étude de l'expression *in vivo* d'un facteur de transcription, GATA-1, qui a évité ces difficultés [1]. Le gène rapporteur utilisé est celui de la GFP *(green fluorescent protein* de l'*Aequorea victoria)*, fluorescente par exposition aux UV. L'organisme vivant est le poisson-zèbre, dont les embryons sont accessibles, transparents, et dont le développement rapide commence en 24 heures. GATA-1, tête de série d'une famille de facteurs de transcription, reconnaît une séquence consensus ; il contrôle des processus importants du développement, en particulier au niveau de l'hématopoïèse ; sa conservation évolutive rend valable une étude chez le poisson-zèbre. Des constructions plus ou moins étendues du promoteur, lié à la GFP, ont permis de suivre sa localisation dans la zone ventrale à 8 heures, dans la masse cellulaire intermédiaire (ICM) à 16 heures, dans l'endocarde, puis dans le rein, qui est le site d'hématopoïèse chez l'adulte. Deux populations de cellules sont identifiées pendant les cinq premiers jours, dont l'une, plus grande et plus brillante, serait le précurseur de l'autre. Une transmission mendélienne spécifique est retrouvée à la deuxième génération. L'ensemble de ces observations récapitule intégralement ce que la biologie moléculaire a pu constater, concernant la migration cellulaire et les sites d'hématopoïèse chez le poisson-zèbre. Une stratégie analogue devrait pouvoir être d'application générale pour l'étude des processus de régulation au cours du développement.

[1. Long Q, *et al. Development* 1997 ; 124 : 4105-11.]

EUROPEAN SCHOOL OF MEDICAL GENETICS - 11th COURSE
Sestri Levante, 21-27 mars 1998

Vendredi 27 mars
SYMPOSIUM MENARINI :
La technologie émergente des puces à ADN (DNA chips)

.