

■■■ **Interactions ADN-protéines *in vitro* et *in vivo*.** L'expression coordonnée et spécifique de tissu des différents gènes de globine est sans doute le résultat d'une série d'interactions ADN-protéines, qui mettent en rapport successivement le LCR (*locus control region*) (*m/s*, n° 4, vol. 5, p. 252), séquence régulatrice située en amont de l'ensemble du *locus*, et chacun des promoteurs individuels. Ces interactions sont étudiées par une série de méthodes classiques qui mettent en contact des ADN nus et différents extraits nucléaires. Les résultats obtenus ainsi *in vitro* pourraient cependant être faussés par la présence, dans les extraits nucléaires, de facteurs ubiquitaires dont la séquence de reconnaissance serait voisine de celle d'un facteur spécifique de tissu, et qui ferait croire à une interaction quand il n'y en a pas. Des méthodes existent, dans lesquelles les cellules intactes sont traitées par le diméthylsulfate (DMS). Les zones ainsi protégées par des facteurs diffusibles fixés *in situ* sont ensuite visualisées par une technique de séquence génomique. Le travail rapporté ici a porté sur les différents sites susceptibles de contrôler l'expression du *locus* β -globine : sites distaux du LCR, essentiellement les sites hypersensibles à la DNase I HS2 et HS3 ; sites proximaux des gènes fœtaux et adulte comportant les régions promotrices des gènes γ et β -globine et les *enhancers* situés en 3' des mêmes gènes (*pour plus de détails, voir mini-synthèse m/s* n° 3, vol. 8, à paraître). L'exploration a été menée dans des cellules K562, (lignée humaine érythroïde embryonnaire/fœtale), avant et après induction, et, par comparaison, dans deux autres lignées : des lymphocytes B (cellules hématopoïétiques non érythroïdes) et des cellules HeLa (cellules non hématopoïétiques). Ce travail a permis de mettre en évidence des différences importantes. Comme on s'y attendait dans des cellules fœtales, des interactions ADN-protéines ont été trouvées au niveau des promoteurs γ , mais pas à celui des promoteurs β -globine. Curieusement, cependant, le motif GATA-1,

la séquence octamère ATGCAAAT ne semblent impliquées dans aucune interaction, ce qui remet en question leur importance fonctionnelle ; une interaction majeure est, en revanche, trouvée, au niveau de la « CACCC box », stimulée par l'hémine et donc sans doute importante pour l'expression du gène. On observe aussi que seul HS2, et pas HS3, est dans ces conditions impliqué dans des interactions, ce qui soulève la question d'un rôle plus spécifique de différents sites hypersensibles à différentes étapes du développement. On sait cependant que le site HS2 est un *enhancer* érythroïde majeur. Les empreintes retrouvées dominantes comportent, outre celles au niveau des motifs GATA1 qui sont érythroïde-spécifiques, des motifs GGTGG, NF-E2/AP1 et GGTGG/AP1. La spécificité des deux derniers sites est attestée par leur absence (GGTGG/AP1) ou leur caractère extrêmement faible (NF-E2/AP1) dans des cellules HeLa. Enfin, aucune empreinte n'a été observée au niveau tant du *enhancer* β , ce qu'on attendait, qu'à celui du *enhancer* γ , ce qui semble plus surprenant, puisque le gène est exprimé. Cette première série d'observations sur le système globine soulève donc la question du rôle effectif *in vivo* de différentes séquences identifiées *in vitro*. La cellule K562 reste toutefois un modèle très particulier ; des études similaires faites dans d'autres lignées, ou dans des cellules plus physiologiques, pourraient progressivement apporter une réponse.

[Ikita T, Kan YW. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 10188-92.]

■■■ **Inhiber la synthèse du monoxyde d'azote pour traiter le choc septique ?** L'endotoxine bactérienne et certaines cytokines augmentent la synthèse de monoxyde d'azote

(NO) en induisant une NO synthase dans les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires (*m/s* n° 10, vol. 7, p. 1094). L'hypotension artérielle, qui accompagne le choc septique, pourrait ainsi être due à la production excessive de NO. L'injection de doses modérées de L-NMMA (un analogue de la L-arginine qui inhibe la formation de NO) chez des rats ayant reçu de l'endotoxine prévient la baisse de la pression artérielle. A l'inverse, des doses fortes de L-NMMA (qui inhibent à la fois la NO synthase inductible et constitutive) aggravent l'hypotension et accélèrent la mort des animaux [1]. Cet effet paradoxal pourrait être expliqué, selon les auteurs, par une vasoconstriction entraînant des dommages irréversibles des organes, conséquence de l'absence totale du NO vasodilatateur et de la présence, en cas de choc septique, de vasoconstricteurs puissants. Petros *et al.* [2] ont utilisé le L-NMMA et un autre inhibiteur, le L-NAME, chez deux sujets en état de choc septique grave, réfractaire aux traitements habituels. Dans les deux cas, ces produits ont entraîné une augmentation dépendante de la dose de la pression artérielle et des résistances vasculaires périphériques, ainsi qu'une amélioration de la fonction rénale. Cet effet peut être rapproché de l'observation rapportée par Midgley *et al.* [3], chez un malade ayant une cirrhose hépatique, une insuffisance hépatique grave et une hypotension artérielle réfractaire. L'injection de bleu de méthylène (qui bloque la stimulation de la guanylate cyclase soluble par le NO et ainsi son effet vasodilatateur) a entraîné une élévation de la pression artérielle durant plus de 60 minutes. En cas de cirrhose, l'hypotension artérielle et la vasodilatation périphérique pourraient être dues à une endotoxémie persistante et à l'hyperproduction de NO.

[1. Nava E, *et al. Lancet* 1991 ; 338 : 1555-57.]

[2. Petros A, *et al. Lancet* 1991 ; 338 : 1557-58.]

[3. Midgley S, *et al. Lancet* 1991 ; 338 : 1590.]

■■■■ Le ciblage incorrect d'une enzyme est responsable d'une forme d'hyperoxalurie. L'hyperoxalurie primitive de type 1 est une affection récessive autosomique létale due au déficit en une enzyme hépatique des peroxysomes, l'AGT ou L-alanine glyoxalate aminotransférase (*m/s n° 1, vol. 4, p. 58*). Dans la majorité des cas, activité et immunoréactivité sont nulles ; mais, dans un tiers des cas, il subsiste une activité résiduelle : chez ces malades, il existe un défaut de transport de la protéine, l'AGT étant dirigée vers les mitochondries au lieu des peroxysomes. Un groupe britannique (Harrow, Middlesex) a cloné l'ADNc normal et celui de malades [1]. Ils ont trouvé trois mutations différentes : Pro 11 → Leu, Gly 170 → Arg, Ile → Met. Associés à des chercheurs de Yale (CT, USA), ils se sont demandé quel est le rôle de chacune de ces mutations dans le ciblage anormal de l'enzyme. La transcription-traduction *in vitro* de plasmides d'expression contenant les diverses mutations, isolées ou associées, produisent une protéine de la taille prévue, 43 kDa, réagissant avec les anticorps. Toutes les préparations contenant la mutation Pro → Leu s'associent aux mitochondries, et non celles qui ne la contiennent pas. C'est donc cette mutation qui est responsable de la fausse route de l'enzyme « malade ». Une situation aussi schématique ne rend toutefois pas compte de ce qui se passe *in vivo* : on sait, en effet, que dans 10 % de la population les mutations Pro → Leu et Ile → Met sont présentes, mais non Gly 170 → Arg, et que, cependant, seulement 10 % de l'enzyme vont aux mitochondries, contre 95 % si cette dernière mutation est également présente. Il est probable que cette mutation est apparue dans une population qui portait déjà les deux autres. De ces résultats, on peut déduire que le changement Pro → Leu ne provoque qu'un signal mitochondrial faible, comparé à celui d'une enzyme purement mitochondriale. Une des observations les plus intéressantes du présent travail [2] est tirée du fait que la localisation de

l'AGT diffère selon les espèces : elle est bien peroxysomiale chez l'homme, le lapin, le cobaye, mais mitochondriale chez le rat ou le chat. Partant de cette constatation évolutive, il a été possible d'établir la raison moléculaire d'une telle différence. Chez le rat, il ne s'agit pas d'un changement du type Pro → Leu. Cet animal possède une séquence supplémentaire de 22 acides aminés du côté N-terminal, scindée au cours de la synthèse, et qui dirige la protéine mûre vers la mitochondrie. Si on étend la phase de lecture de la protéine humaine des 22 acides aminés identiques à ceux du rat, on aboutit après scission à une protéine identique à l'AGT humaine, mais dirigée vers les mitochondries. Si l'enzyme humaine ne possède pas ce peptide signal, c'est parce que le codon initial ATG du rat est, chez l'homme, devenu ATA et donc incapable d'initier la synthèse. On pourrait, en principe, découvrir un malade ayant muté l'ATA en ATG et reconstituant le processus de synthèse du rat. On comprend ainsi à la fois pourquoi rat et homme diffèrent dans la localisation subcellulaire de leur enzyme AGT, et pourquoi les lésions moléculaires de l'hyperoxalurie rétablissent un phénotype du type rat. Ce qu'on ne sait pas encore, c'est la raison pour laquelle la re-création d'une situation normale dans une espèce est létale dans une autre espèce, la nôtre. [1. Purdue PE, *et al. J Cell Biol* 1990 ; 111 : 2341-51.] [2. Purdue PE, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 10900-4.]

■■■■ Liaison du syndrome cardiaque du long espace QT au proto-oncogène *Harvey RAS-1* : une confirmation. Le syndrome du long espace QT (LQT) provoque des troubles cardiaques chez le nourrisson (il est responsable de certains cas de mort subite) et constitue un facteur de risque chez le sujet âgé. Il en existe aussi des formes familiales qui reconnaissent une hérédité autosomique dominante. L'an dernier *m/s*

(*n° 6, vol. 7, p. 640*) a rapporté qu'une équipe de Salt Lake City (UT, USA) avait découvert une liaison avec le locus du proto-oncogène *Harvey Ras-1* sur le chromosome 11 en 11p15. Bien que convaincante, cette observation portant sur une seule famille demandait confirmation et extension. C'est désormais chose faite, puisque la même équipe [1] vient de retrouver cette liaison dans six familles non apparentées. Puisqu'aucun recombinant n'a été observé, *Harvey Ras-1* devient un candidat sérieux comme gène du syndrome LQT. Outre la recherche de la nature des mutations, désormais nécessaire, deux axes se dessinent : sur le plan pratique, on peut envisager la détection présymptomatique du syndrome dans les cas où l'ECG donne des résultats douteux. Cela n'est pas indifférent car un traitement est possible, tant pharmacologique (β -bloquants) que préventif (éviter les exercices violents et notamment les plongeurs). Sur le plan de la pathogénie, nous avons déjà signalé que la petite protéine p21^{ras}, ainsi que la protéine GAP (*GTPase activating protein*), contrôlent les canaux potassiques musculaires. Un dysfonctionnement des canaux potassiques cardiaques pourrait provoquer un LQT. Les oncogènes ont donc désormais acquis droit de cité en cardiologie. [1. Keating M, *et al. Am J Hum Genet* 1991 ; 49 : 1335-9.]

■■■■ Rôle possible d'une séquence polypyrimidique dans la commutation périnatale de l'expression des gènes β -globine. La régulation de l'expression des gènes de β -globine au cours du développement a suscité et continue à susciter de nombreux travaux (*m/s n° 4, vol. 5, p. 252 ; n° 6, vol. 6, p. 527 ; n° 9, vol. 6, p. 918 et 926 ; n° 7, vol. 7, p. 740*). La compréhension de ses mécanismes pourrait ouvrir une approche nouvelle dans la thérapeutique des hémoglobi-nopathies héréditaires majeures. Cette famille de gènes représente par ailleurs un modèle pour l'étude de la

régulation des gènes eucaryotes. L'étude des facteurs transactivateurs impliqués dans l'expression des gènes de globine humaine n'en a jusqu'à présent montré aucun qui soit spécifique de la commutation du stade fœtal au stade adulte. En revanche, certains travaux faits chez le poulet ont mis en évidence deux facteurs, le BPG1 qui se lie à une séquence poly(dG), et le NF-E4 qui reconnaît une séquence polypurine, et dont on pense qu'il pourrait être le médiateur dans la transition du stade fœtal au stade adulte. Une exploration systématique des 70 kb du locus β -globine humain a montré, de part et d'autre du gène δ , une séquence identique à celle qui fixe le NF-E4 chez le poulet (AAGAGGAGG). Un article récent étudie la région avoisinant l'une de ces séquences, et met en évidence un facteur nucléaire et sa liaison à une alternance de pyrimidines (CCTTCCTTCC), 960 pb en amont du gène δ -globine, elle-même située dans un environnement de 250 pb exceptionnellement riche en pyrimidines. La fixation de ce facteur est strictement spécifique de tissu, chez l'homme comme chez la souris. Elle n'est retrouvée qu'en présence de tissus hématopoiétiques adultes, et les expériences de compétition montrent qu'elle est renforcée si ce motif, appelé *pyr*, est entouré de ses séquences flanquantes. Dans des plasmides super-enroulés, l'ensemble du domaine de 250 pb présente plusieurs sites d'hypersensibilité à la nucléase S1, spécifique des ADN simple brin, ce qui témoigne de la propension qu'ont ces séquences à adopter une conformation inhabituelle, peut-être une structure triple brin. On pense que ce type de structure pourrait jouer un rôle important dans la régulation des gènes eucaryotes, les différentes conformations, en équilibre entre elles, dépendant des conditions d'environnement. Un facteur actif en *trans* pourrait stabiliser une des structures de l'ADN et induire ainsi un changement conformationnel au cours du développement. Les différentes données expérimentales confortent l'hypothèse du rôle qu'aurait une

structure alternative de l'ADN ; une conformation définie semble, en effet, nécessaire pour l'interaction avec le facteur *pyr*... Une autre observation renforce cette hypothèse : un haut degré de conservation à travers l'évolution évoque toujours un rôle fonctionnel pour la séquence conservée. L'intervention de cette séquence polypyrimidique située entre le domaine fœtal et le domaine adulte du locus β -globine (voir *mini-synthèse m/s n° 3, vol. 8, à paraître*) dans la commutation d'expression au cours du développement n'est encore qu'une hypothèse. C'est cependant la première fois qu'un facteur actif en *trans* est démontré être spécifique d'une étape de ce développement. Sa caractérisation, et l'étude d'autres séquences polypyrimidiques situées dans les premiers introns des deux gènes γ pourrait apporter un éclairage sur un phénomène fascinant et encore mal compris.

[O'Neill D. *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 8953-7.]

■■■ Le nombre de répétitions codées par le gène des prions est une cause de maladie de Creutzfeldt-Jakob. Parmi les causes des formes familiales de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, on a incriminé des mutations et des insertions dans le gène des prions. L'inventaire en a été fait dans une *nouvelle* de juin 1991 (*m/s n° 6, vol. 7, p. 626*). Le rôle des insertions restant obscur, une équipe internationale a entrepris de le clarifier [1]. Elle a examiné 535 individus : 117 malades dont 60 cas familiaux, 159 apparentés aux malades, le reste atteint d'autres affections ou témoins normaux. Dans leur ADN ont été recherchés le nombre et la nature des répétitions d'octapeptides dans la région qui s'étend normalement des codons 51 à 91. L'objectif était double, établir solidement la structure normale de cette région, connaître les anomalies éventuellement associées à la maladie. **Struc-**

ture normale de la zone répétitive du gène. Les 40 codons qui vont de 41 à 91 sont formés d'une répétition de 5 octamères. Les motifs 2 et 3 sont identiques, les trois autres en diffèrent par un ou deux nucléotides. **Nombre anormal de répétitions.** Les auteurs ont trouvé une fois neuf répétitions, chez un témoin, 10, 12 et 13 fois dans trois familles. Ces observations s'ajoutent à celles qu'a faites antérieurement un autre groupe [2] qui a trouvé, chez des malades, 6, 11 et 14 répétitions. On peut donc penser qu'un nombre supérieur à neuf a de fortes chances d'être pathogène, alors que neuf ne le seraient pas, et que, en revanche, six répétitions pourraient être associées à la maladie. Le mécanisme d'apparition de ces octamères supplémentaires pourrait être un *crossing-over* inégal. La présence de ces suppléments favoriserait une conversion de la protéine normale en une forme inhabituelle pathologique. Enfin, sur le plan clinique, ces formes sont caractérisées par un début précoce et une évolution lente. Elles partagent les caractères de transmissibilité des autres formes d'encéphalopathies spongiformes.

[1. Goldfarb LG, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 10926-30.]

[2. Owen F, *et al. Exp Neurol* 1991 ; 112 : 240-2.]

■■■ Vers un modèle animal de la mucoviscidose. Nous avons rappelé dans ces colonnes que l'un des obstacles au développement de la thérapie génique de la mucoviscidose était l'absence d'un modèle animal et que ce dernier pouvait être construit grâce à l'utilisation de la mutagenèse insertionnelle par recombinaison homologique (*m/s n° 1, vol. 7, p. 84*). D.H. Koller, de l'équipe de Oliver Smithies, vient de rapporter l'interruption de l'exon 10 du gène CFTR, dont l'altération est responsable de la mucoviscidose [1], par recombinaison homologue. La méthode utilisée est

maintenant classique : elle comporte un vecteur permettant une double sélection, positive des transfectants et négative de ceux d'entre eux n'ayant pas précisément intégré le transgène au niveau du site homologue [2]. L'exon 10 est celui où est localisée la mutation δ -phénylalanine-508, de loin la plus fréquente des mutations responsables de mucoviscidose [1]. De plus, une mutation avec décalage de lecture aboutissant à une interruption de la traduction dans cet exon entraîne une forme très grave de la maladie. L'équipe de O. Smithies (Chapel Hill, NC, USA) eut quelques difficultés à isoler des cellules ES porteuses de cette mutagénèse insertionnelle puisque, dans ce cas, le rapport de la fréquence des événements de recombinaison homologue sur la totalité des événements de recombinaison n'est que de 1 sur 2 500 [3] alors que des résultats de l'ordre de 1 sur 100 à 1 sur 300 sont maintenant régulièrement obtenus [2]. A ce stade, les auteurs ne rapportent pas encore l'obtention d'animaux chimères, puis, après passage dans la lignée germinale, d'animaux hétérozygotes et, encore moins, le phénotype des animaux homozygotes obtenus par croisement. Toutes ces informations seront très probablement l'objet d'un prochain article. Si tout se passe bien, et surtout si les souris homozygotes ont un phénotype mimant raisonnablement la maladie humaine, elles seront un outil formidable pour tester l'efficacité de transgènes thérapeutiques, par exemple administrés *via* un adénovirus recombinant comme cela vient d'être rapporté pour le gène *CFTR* par Rosenfeld *et al.* des laboratoires de R. Crystal (NIH, Bethesda, MD, USA), Perri-caudet (Villejuif, France) et de Transgène (Strasbourg, France) [4].

[1. Goossens M. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 1048-51.]
 [2. Lemarchandel V, Montagutelli X. *medecine/sciences* 1990 ; 6 : 1829.]
 [3. Koller DH *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 10730-4.]
 [4. Rosenfeld MA *et al.* *Cell* 1992 ; 68 : 143-55.]

■■■■ **Un herbicide bien nourissant !** Cela fait maintenant plusieurs années que l'on sait transférer dans une plante un gène conférant une résistance à un herbicide. Une telle propriété peut être obtenue par deux procédés : la dégradation de l'herbicide sous l'action du produit du transgène, ou bien la résistance vraie à l'agent toxique induite par un transgène codant pour une variante de la cible normale de l'herbicide, modifiée de telle sorte qu'elle devienne insensible à cet agent. Les conséquences de ces deux mécanismes de résistance aux herbicides sont que le produit initial ou certains de ses dérivés s'accumulent, ce qui peut avoir des conséquences potentiellement défavorables pour l'environnement, voire même poser de possibles problèmes de toxicité pour les consommateurs. G. Hartmann *et al.* (Munich, Allemagne) [1] viennent d'apporter une solution originale à ce problème en transférant dans du tabac le gène de la cyanamide hydratase qui est capable de dégrader l'herbicide (du cyanamide, de formule H_2NCN) en urée (formule HN_2CONH_2) qui peut servir d'engrais azoté aux plantes. L'urée de celles-ci dégradent en effet l'urée en la transformant en ions ammonium (NH_4^+) qui sont une très bonne source d'azote pour les végétaux. Dans ces conditions, l'herbicide tuera les adventices (c'est-à-dire les mauvaises herbes) et, au niveau de la plante transgénique, sera dégradé en urée qui servira d'engrais.

[1. Bradley D. *New Scientist* 1992 ; 113 : 11.]

■■■■ **Liaison à l'ADN de la protéine SRY.** Dans une des dernières livraisons de la revue *Science* (à paraître le 24 janvier 92), Harley *et al.* démontre la liaison de la protéine SRY au motif nucléotidique 5'AACAAAG3', motif reconnu par le facteur de transcription spécifique du lymphocyte T, TCF-1 [1]. Sur ces sept nucléotides, seules les positions

2, 4, 5 et 6 apparaissent ne pouvoir souffrir aucune altération. Tout comme cela avait été récemment reporté pour le motif décrit par l'équipe d'Alexander-Bridges (*m/s* n° 10, vol. 6, p. 112) [2], des mutations *de novo* observées chez des femelles XY, dans le domaine de liaison à l'ADN de la protéine SRY, abolissent toute association protéine-ADN. Il est intéressant de noter que pour une femelle XY dont la mutation se trouvait être déjà présente sur le chromosome Y de son père, cette abolition reste partielle. Ceci peut suggérer, dans ce cas, une pénétrance partielle de la mutation. De plus ce motif nucléotidique est présent en amont du gène SRY humain mais également du *sry* murin. Est-ce pure coïncidence ou SRY participe-t-il à son propre contrôle ? Si cela est le cas, la liaison du produit de SRY sur ce motif serait indépendante du contexte dans lequel se trouve placé cet heptanucléotide. Cela laisse la porte ouverte à diverses hypothèses, dont l'une serait l'existence d'un complexe de transcription multiprotéique incluant la protéine SRY et lui fournissant sa spécificité de liaison.

[1. Van de Wetering M *et al.* *Embo J* 1991 ; 10 : 123-32.]

[2. Nasrin N *et al.* *Nature* 1991 ; 354 : 317-20.]