

Transfert d'un gène tueur dans les cellules tumorales

Une limitation des vecteurs rétroviraux en thérapie génique est qu'ils ne peuvent infecter que des cellules en division rapide. Cela limite leur utilisation pour certains types cellulaires qui ne peuvent être cultivés *ex vivo* et qui se divisent peu [1]. Il est cependant possible de prendre avantage de cette propriété pour limiter l'infection rétrovirale à une population cellulaire se divisant particulièrement activement, par exemple des cellules tumorales. C'est ce qu'ont réussi de façon spectaculaire K.W. Culver *et al.* du laboratoire de R. Michael Blaese (NIH, Bethesda, MD, USA). Ces auteurs ont construit des rétrovirus recombinants contenant le gène de la thymidine kinase du virus *Herpes simplex*. Cette enzyme peut phosphoryler des analogues de nucléosides, permettant ainsi leur incorporation dans l'ADN et, de ce fait, la destruction des cellules synthétisant cette enzyme. Il existe un autre système permettant de sensibiliser spécifiquement certaines cellules à l'action cytotoxique de médicaments : il s'agit de l'enzyme bactérienne cytosine désaminase qui est capable de convertir le produit normalement non toxique 5-fluorocytosine en le composé cytotoxique 5-fluoro-uracile qui va alors tuer la cellule [3]. Lorsque un mélange de cellules cancéreuses et de cellules produisant le rétrovirus recombiné avec le gène thymidine kinase (*HS-tk*) est greffé sous la peau d'animaux receveurs, un traitement de l'animal par le ganciclovir, un analogue de la thymidine, provoque le rejet total de la greffe cancéreuse. Ce résultat est d'autant plus remarquable que des expériences uti-

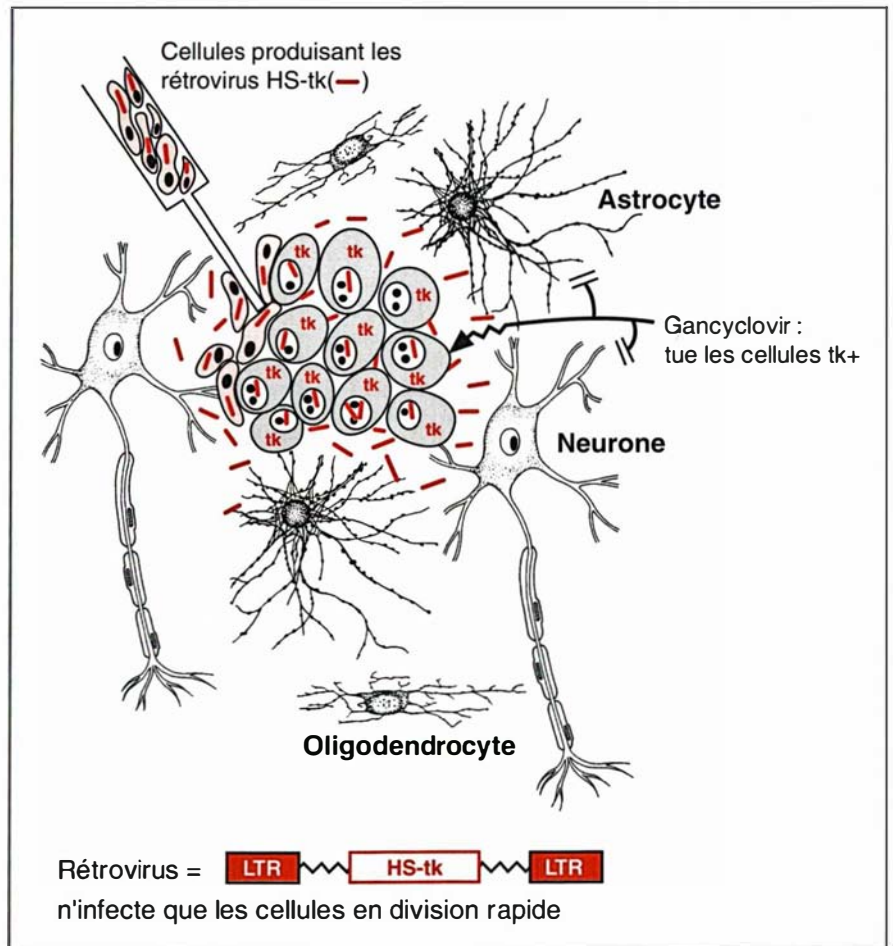


Figure 1. **Schéma de la destruction spécifique de cellules cancéreuses dans le cerveau par implantation de fibroblastes murins produisant le rétrovirus HS-tk.** Le rétrovirus va spécifiquement infecter les cellules en prolifération rapide, c'est-à-dire les cellules cancéreuses et, éventuellement, les cellules endothéliales participant à l'angiogenèse tumorale. La synthèse de thymidine kinase du virus Herpes sensibilisera toutes ces cellules au ganciclovir, qui les détruira spécifiquement, en revanche, les différentes cellules cérébrales, neurones ou cellules de la glie (astrocytes, oligodendrocytes), ne se divisent pas ou se divisent peu, et sont par conséquent protégées de l'infection rétrovirale.

lisant un rétrovirus contenant uniquement un gène marqueur ont permis de montrer que seulement 60 % des cellules cancéreuses étaient infectées par le rétrovirus recombinant. Il semble donc que la destruction directe d'une certaine proportion des cellules cancéreuses provoque, par un mécanisme encore bien obscur, l'élimination conjointe de cellules tumorales avoisinantes ne contenant pas le transgène, tout en respectant les tissus environnants. Peut-être le phénomène en cause est-il la transmission par contiguïté d'un signal apoptotique entre cellules homologues ? Les auteurs ont alors voulu tester cette approche dans des conditions expérimentales mimant une tumeur réelle *in vivo*. Des cellules tumorales dérivées d'un gliome ont été greffées dans un hémisphère cérébral de rat. L'évolution spontanée de la tumeur conduit à la mort de l'animal. Une injection stéréotaxique de fibroblastes murins producteurs du rétrovirus *HS-tk* a alors été pratiquée après l'implantation du tissu tumoral. Cinq jours après cette opération, les animaux ont été traités par le ganciclovir. Chez 11 animaux sur 14, une régression complète, macroscopique et microscopique, de la tumeur fut observée. Au niveau de l'encéphale, les seules cellules à proliférer activement sont les cellules cancéreuses (figure 1), ce qui

explique la spécificité des particules rétrovirales qui respectent les structures nerveuses normales avoisinantes. Des contrôles ont également démontré que le traitement par le ganciclovir ne semblait pas entraîner de toxicité pour les cellules médullaires ou intestinales, dotées naturellement d'un fort taux de renouvellement. Cela peut signifier que la quantité de rétrovirus recombinant s'échappant du site d'injection a été faible. Cependant, le groupe de Blaese a observé que, même par injection intrapéritonéale directe, cette préparation rétrovirale semblait peut toxique pour les cellules normales de l'organisme, y compris celles se divisant rapidement. Cette relative résistance mérite certainement d'être vérifiée et reste assez mystérieuse. Les résultats de cette étude sont tout à fait spectaculaires et leurs promesses semblent considérables. Beaucoup de tumeurs cérébrales sont inopérables, si bien qu'une telle approche thérapeutique pourrait être justifiée. De plus, cette approche peut amener à la destruction sélective, non seulement des cellules tumorales, mais aussi des cellules endothéliales participant à l'angiogenèse, si importante pour la progression de la tumeur, et donc en prolifération active. Enfin, le cerveau est un site immunologiquement protégé, ce qui pourrait permettre de prolonger la durée de survie des

cellules productrices de rétrovirus, et par conséquent la durée de l'infection des cellules tumorales par le gène de sensibilisation au ganciclovir. De toute façon, le traitement par ce dernier produit détruira complètement les fibroblastes producteurs de virus puisque, ce faisant, ils synthétisent la thymidine kinase virale. Toutes ces caractéristiques ont poussé les instances compétentes américaines à donner un premier avis favorable à l'utilisation d'un tel protocole thérapeutique chez un petit nombre de malades humains atteints de cancers inopérables du système nerveux central. Cependant, les perspectives de cette approche ne sont probablement pas limitées aux tumeurs cérébrales, si bien qu'il se pourrait que la stratégie de Culver *et al.* constituât vraiment un tournant important de l'histoire des traitements anticancéreux.

A.K.

1. Kahn A, Briand P. Thérapie génique ; espoirs et limites. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 705-14.
2. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992 ; 256 : 1550-2.
3. Mullen CA, Kilstrup M, Blaese RM. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confer lethal sensitivity to 5-fluorocytosine : a negative selection system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 33-7.

■■■ BRÈVE ■■■

■■■ Une ectopeptidase, l'aminopeptidase M, est le récepteur de différents groupes de coronarivirus chez l'homme et chez l'animal. Les coronarivirus sont responsables d'infections des voies respiratoires supérieures et du tube digestif chez l'homme et différentes espèces de mammifères. Leur responsabilité a également été proposée dans certaines atteintes neurologiques [1]. Chez le porc, l'un de ces virus, le TGEV (*transmissible gastroenteritis virus*) est un pathogène important entraînant des diarrhées fatales de l'animal nouveau-né. B. Delmas, du laboratoire de H. Laude (INRA, Jouy-en-Josas, France), en collaboration avec une équipe danoise de Copenhague, démontre qu'une ectopeptidase [2], l'aminopeptidase M, est le récepteur majeur du virus. Un anticorps

monoclonal capable d'inhiber l'infection se révéla reconnaître une protéine de 150 kDa de la bordure en brosse entérocytaire qui put être identifiée à l'aminopeptidase. Les virions peuvent se lier spécifiquement à cette enzyme, et le transfert dans une cellule non permissive pour l'infection virale, d'un ADN recombinant commandant la synthèse de l'aminopeptidase N confère à cette cellule la propriété d'être infectée. Dans le même numéro de *Nature*, une équipe américaine de Bethesda (MD) et de Memphis (TE) démontre, par des techniques extrêmement proches, que cette même enzyme est le récepteur de coronarivirus humains appartenant au séro-groupe HCV-229 E, mais non au groupe HCV OC 43. Ces deux types de virus sont responsables d'infections des

voies respiratoires supérieures chez l'homme [4]. Ces résultats étendent donc les exemples de virus utilisant, pour infecter des cellules animales, des récepteurs de circonstance dévoyés de leur fonction spécifique propre : CD4 pour HIV, ICAM-1 pour les rhinovirus, un antigène carcino-embryonnaire pour le coronarivirus de l'hépatite murine, un transporteur d'acides aminés pour des rétrovirus de la leucémie murine, etc.

- [1. Talbot P, Jouvenne P. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 119-26.]
- [2. Bauvois T. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 441-8.]
- [3. Delmas D, *et al.* *Nature* 1992 ; 357 : 417-20.]
- [4. Yeager CL, *et al.* *Nature* 1992 ; 357 : 420-2.]

■■■ Les gènes codant pour les chaînes $\alpha 3$ et $\alpha 4$ du collagène de type IV sont localisés à l'extrémité du bras long du chromosome 2. Le groupe de S. Reeders, à l'Université de Yale, New Haven, avait déjà localisé le gène codant pour $\alpha 3$ (IV) dans la région 2q35-q37. Ce même groupe vient de localiser le gène codant pour $\alpha 4$ (IV) dans la même région [1]. Ces deux chaînes entrent dans la constitution de certaines membranes basales et notamment $\alpha 3$ est présente dans la membrane basale glomérulaire rénale. Les gènes codant pour $\alpha 3$ et $\alpha 4$ sont très proches mais leur disposition exacte reste à préciser. Il faut rappeler que les gènes codant pour $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (IV) sont situés tous deux dans la région 13q24, « tête-contre-tête », avec un promoteur commun bidirectionnel permettant une régulation coordonnée de ces 2 chaînes qui sont des constituants majeurs des membranes basales et forment notamment des hétérotrimères [$\alpha 1$]₂. [$\alpha 2$]. L'organisation génomique est-elle identique pour les gènes codant pour $\alpha 3$ et $\alpha 4$? Ces informations sont importantes pour ceux qui s'intéressent aux maladies rénales héréditaires qui touchent la membrane basale glomérulaire, comme le syndrome d'Alport.

[1. Mariyama M. *et al. Genomics* 1992 ; 13 : 809-13.]

■■■ Amylose de la gelsoline : un nouveau fait clinique. Cette variété d'amylose se traduit par une dystrophie cornéenne et une neuropathie des nerfs crâniens apparaissant vers l'âge de 40 ans [1]. La maladie se transmet selon le mode dominant autosomique. Maury *et al.* [2] (Helsinki, Finlande) ont étudié une famille où existent deux sujets homozygotes pour la mutation. Les deux parents, cousins du premier degré, étaient tous deux atteints. Chez les deux homozygotes, les manifestations cliniques sont précoces. Surtout une atteinte rénale avec syndrome néphrotique et dépôt massif d'amylose, se développe vers l'âge de 20 ans, conduisant à l'insuffisance rénale terminale, respectivement à 31

et 36 ans. Chez l'hétérozygote, une protéinurie transitoire est habituelle mais le syndrome néphrotique est très rare et tardif. L'homozygotie dans les maladies héréditaires dominantes a des conséquences variables. Dans ce type d'amylose, l'atteinte viscérale est plus grave, probablement du fait d'une production plus importante de la gelsoline anormale, précurseur de la substance amyloïde [1].

[1. Grateau G. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 524-31].

[2. Maury C.P.J. *et al. Genomics* 1992 ; 13 : 902-3].

■■■ L'horloge moléculaire de l'ADN mitochondrial diffère entre l'homme et le requin. Les spécialistes des mitochondries tendent à mesurer les distances génétiques entre espèces voisines ou à l'intérieur d'une espèce par les différences de séquences d'ADNmt. Ce travail, effectué d'abord chez les primates, a été étendu à d'autres mammifères. On en a déduit l'existence d'une horloge moléculaire, qu'on voudrait appliquer à l'ensemble des vertébrés. Une équipe américaine (Honolulu, Hawaï et New-York) a testé cette hypothèse sur 13 espèces de requins appartenant à 2 groupes, dénommés Lamniformes et Carcharhiniformes [1].

La première apparition de chaque lignage est rapportée aux fossiles les plus anciens. Des sections d'environ 1 000 pb des gènes du cytochrome b et de la cytochrome oxydase 1 ont été séquencées. Le taux de substitution s'est montré 7 à 8 fois plus lent chez toutes les espèces de requins que chez les primates, montrant une évolution beaucoup plus lente. Dans l'interprétation on a éliminé les causes possibles de biais (composition en nucléotides, usage et sélection des codons). L'explication la plus probable est celle de la différence métabolique entre homéo- et poïkilothermes de taille comparable. Le métabolisme du requin est 5 à 10 fois plus lent que celui d'un mammifère de même taille. Or le taux de mutation de l'ADN mt est fonction de l'activité métabolique, probablement parce que les radicaux oxygène sont de puis-

sants mutagènes [2]. Il sera intéressant de savoir si cette notion peut être généralisée [3].

[1. Martin AP, *et al. Nature* 1992 ; 357 : 153-5.]

[2. Adelman R, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 88 : 2706-8.]

[3. Thomas WK, Beckenbach AT. *J Mol Evol* 1989 ; 29 : 233-45.]

■■■ Ménopause, ostéoporose et interleukine 6. La résorption osseuse avec activation des ostéoclastes est une des conséquences de la carence en oestrogène chez les femmes ménopausées. Il semble, selon plusieurs laboratoires américains de l'Indiana, de la Californie et du Texas [1] qu'une augmentation de la synthèse d'interleukine 6 puisse être responsable de cet effet. En effet, les oestrogènes sont capables, en culture de tissus, de bloquer la production de l'interleukine 6 par les cellules stromales de l'os et de la moelle. Chez la souris, une ovariectomie aboutit à une augmentation du nombre d'ostéoclastes qui est contre-balancée par l'administration d'oestrogènes ou d'anticorps anti-interleukine 6.

[1. Jika RL, *et al. Science* 1992 ; 257 : 88-91.]

■■■ Une mucoviscidose à expression génitale ? L'absence congénitale des canaux déférents fait partie du tableau clinique de la mucoviscidose chez le garçon. On peut par ailleurs rencontrer cette affection, cause d'infertilité, de façon isolée, c'est-à-dire sans qu'aucune symptomatologie pulmonaire ou intestinale ne lui soit associée (avec une fréquence 0,04 %). Il était donc légitime de rechercher un lien moléculaire à ces deux entités cliniques. Une équipe américaine de Boston (MA, USA) [1] a recherché des mutations dans le gène CFTR (*cystic fibrosis conductance trans-regulator*) chez 25 hommes présentant une absence congénitale bilatérale isolée des canaux déférents. Seize d'entre eux présentent une mutation d'au moins un de leur gène CFTR ; parmi ces derniers, 13 portent la mutation la plus fréquemment ren-

contrée dans la mucoviscidose, la mutation appelée $\Delta F508$ (délétion d'une phénylalanine en position 508). Dans trois cas, une mutation différente a été trouvée sur les deux allèles des patients définissant ainsi trois sujets hétérozygotes composites : l'un des allèles porte la mutation $\Delta F508$ et l'autre allèle porte une mutation ponctuelle (une transition G en A ou C en T) dans le domaine de liaison à l'ATP de la protéine CFTR. Il semble donc que cette absence congénitale des canaux déférents représente un phénotype génital de la mucoviscidose. En attendant que soient établies les corrélations entre les mutations et les formes cliniques de la mucoviscidose, cette observation a déjà un retentissement important sur le conseil génétique de cette affection. En effet, l'absence congénitale des canaux déférents s'accompagnant d'une spermatogenèse normale, il est possible de pallier l'infertilité par aspiration des spermatozoïdes directement dans l'épididyme. Le risque pour ces patients d'avoir un enfant porteur d'une forme, soit intestinale et pulmonaire, soit génitale de mucoviscidose est accru et il conviendra donc désormais de rechercher une mutation du gène CFTR chez leurs conjoints. Un tel conseil génétique s'appliquera également aux frères et sœurs d'un patient qui ont un risque important d'être hétérozygotes pour ces mutations.

[1. Anguiano A, *et al.* *JAMA* 1992 ; 267 : 1794-7.]

■■■ Protéines G, GTPase et effecteur : le cas de la transducine.

Les lecteurs de *médecine/sciences* sont maintenant bien avertis de ce que, dans le système des petites protéines G p21^{ras}, la protéine p120-GAP est non seulement un régulateur négatif activant l'hydrolyse du GTP lié à p21^{ras} activé, mais encore un intermédiaire permettant le transfert du signal à un (ou des) effecteur(s) aval [1]. Arshavsky et Bownds (Madison, WI, USA) [2] viennent maintenant de préciser les relations existant entre une grande protéine G trimérique, l'activité GTPasique et

une molécule effectrice. La transducine est la protéine G permettant le transfert du signal de la rhodopsine, récepteur sensible à la lumière dans les bâtonnets de l'œil, à la phosphodiesterase à GMP cyclique qui est la molécule effectrice. L'activation de cette dernière enzyme entraîne une hydrolyse du GMP cyclique et, de ce fait, une fermeture d'un canal cationique de la membrane cellulaire. La phosphodiesterase (PDE) à GMPc est trimérique, comme la transducine elle-même. La stimulation de la rhodopsine par la lumière aboutit à l'activation de la sous-unité α transducine, c'est-à-dire au remplacement du GDP par du GTP. L'interaction entre cette sous-unité $G\alpha$ et la sous-unité γ de la PDE stimule l'activité GTPasique de $G\alpha$, exactement comme la protéine GAP stimule l'activité GTPasique de p21^{ras}. Dans les deux cas, il y a coïncidence entre la transmission du signal à un effecteur et la désactivation du système par l'hydrolyse du GTP. Dans le cas du système transducine/PDE, un niveau supplémentaire de régulation a été mis en évidence par les auteurs [2] : le GMP cyclique, probablement par l'intermédiaire des sous-unités α et β de la PDE, diminue le pouvoir activateur de PDE- γ sur l'activité GTPasique de $G\alpha$. De ce fait, la diminution du GMPc, qui est la conséquence d'une stimulation lumineuse, va s'accompagner d'une augmentation de la dégradation du GTP lié à $G\alpha$, et, par conséquent, va aboutir à une désactivation du système, limitant dans le temps les effets de la stimulation lumineuse.

[1. Kahn A. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 471-5.]

[2. Arshavsky VY, Bownds MD. *Nature* 1992 ; 357 : 416-7.]

■■■ Génétique moléculaire du syndrome de Gorlin.

Le syndrome de Gorlin ou nævomatose basocellulaire est une maladie héréditaire, autosomique dominante, caractérisée par des épithéliomas cutanés basocellulaires, des kystes mandibulaires, des anomalies du développement (bec-de-lièvre, polydactylie, anomalies oculai-

res) et parfois d'autres tumeurs (médulloblastomes, sarcomes et fibromes ovariens). La prévalence minimum est de 1 sur 57 000. Un malade sur 200 ayant des épithéliomas cutanés basocellulaires a ce syndrome, mais la fréquence est bien plus grande chez les sujets où les épithéliomas apparaissent avant 19 ans (1 sur 5) [1]. Grâce à une étude de liaison, à l'aide de différents marqueurs, Farndon *et al.* (Birmingham et Manchester, GB) et Reis *et al.* (Allemagne, Suède et Tchécoslovaquie) ont localisé le gène mutant sur le bras long du chromosome 9, dans la région 9q22.3-q31 [1, 2]. M.R. Gailani *et al.* (Bethesda, USA), en utilisant d'autres marqueurs, ont trouvé une localisation analogue. En outre, l'analyse de l'ADN tumoral (épithéliomas basocellulaires, sporadiques et héréditaires) a mis en évidence des pertes d'allèles dans la même région. En étudiant 33 *loci* situés sur les 22 autosomes, presque 50 % des tumeurs comportaient des pertes d'allèles sur le chromosome 9 ; dans trois cas, il existait d'autres pertes d'allèles sur d'autres chromosomes, dont le chromosome 3p dans un cas ; à part ce dernier cas, la perte d'allèles ne concernait pas des régions incluant des gènes suppresseurs de tumeurs, connus ou suspects. A l'aide de RFLP, Gailani *et al.* ont trouvé des pertes d'allèles dans 72 % des tumeurs, dans la région 9q31, notamment dans les cas avec syndrome de Gorlin. Ces résultats suggèrent que ce syndrome est dû à une mutation dans un gène suppresseur de tumeur localisé sur le chromosome 9q qui joue un rôle important, à la fois dans le développement normal et le contrôle de la croissance des cellules précurseurs de l'épithélioma cutané basocellulaire. La perte d'hétérozygotie implique que les deux allèles du gène sont inactivés, de façon homozygote, à l'image de ce qu'on connaît dans le rétinoblastome héréditaire, la tumeur de Wilms ou le syndrome de Li-Fraumeni (*m/s* n° 10, vol. 6, p. 1006). Les auteurs indiquent enfin que le gène du syndrome de Ferguson-Smith (carac-

térisé par des tumeurs épidermiques multiples, d'un type différent) a la même localisation que celui du syndrome de Gorlin ; les deux syndromes pourraient être dus à différentes mutations dans le même gène [3].

[1. Farndon PA, *et al. Lancet* 1992 ; 339 : 581-2.]

[2. Reis A, *et al. Lancet* 1992 ; 339 : 617.]

[3. Gailani MR, *et al. Cell* 1992 ; 69 : 111-7.]

■■■ **Blé transgénique.** Les céréales (riz, maïs, blé) représentent toutes ensemble près de 50 % des plantes utilisées dans l'alimentation des populations humaines. Appartenant à la classe des monocotylédones, ces espèces sont demeurées pendant plusieurs années inaccessibles aux méthodes de transformation génétique. En effet, la technique la plus utilisée de création des plantes transgéniques est le transfert d'ADN intégré dans le plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*. Cette approche n'est cependant pas accessible aux monocotylédones. Il était certes possible de transférer de l'ADN dans des cellules végétales isolées, sous forme de protoplastes, en utilisant des chocs électriques (électroporation) ou, de plus en plus à l'heure actuelle, le canon à particules. Ce dernier procédé consiste en le bombardement des cellules à transformer par des micro-projectiles de tungstène ou d'or sur lesquels est adsorbé l'ADN transformant. Ces micro-projectiles sont mûs, soit par de petites charges de poudre, soit, dans des développements plus récents, par de l'hélium. Ce procédé de transformation génétique par micro-bombardement est d'ailleurs si efficace que ses applications ont aujourd'hui dépassé le monde de la biologie végétale pour devenir une alternative extrêmement sérieuse aux techniques classiques de transfert d'ADN dans des cellules animales. Dans certaines expériences, il a même été possible d'effectuer un transfert d'ADN chez l'animal *in vivo*. Pour en revenir au monocotylédones, et plus particulièrement aux céréales, la difficulté réside en la régénération

d'une plante entière à partir des cellules isolées. Cela a, finalement, été réussi avec le riz et le maïs. Les cellules sont cultivées de telle sorte qu'elles forment un cal embryogénique à partir duquel la plante peut être régénérée. Pour ce qui concerne le blé, cependant, la manipulation prolongée des cellules isolées faisait perdre au cal obtenu son potentiel embryogénique. Des chercheurs de l'Université de Floride (Gainesville, USA) et de la firme Monsanto (Saint-Louis, MO, USA) ont alors décidé de bombarder directement un cal végétal avec de l'ADN conférant une résistance à un herbicide, la phosphinotricine [1]. Dans ce cas, l'étape de manipulation de cellules isolées était omise. Le rendement de l'opération est très faible, 1 % seulement des cals ainsi traités pouvant être régénérés en plantules en présence de l'herbicide. Cela dit, et c'est ce qui importe, du blé transgénique apparemment normal et fertile a été obtenu. La possibilité existant aujourd'hui d'améliorer par transgénèse les céréales est manifestement une donnée essentielle dans l'évolution du monde et dans sa lutte pour sa subsistance.

[1. Vasil V, *et al. Biotechnology* 1992 ; 10 : 667-3.]

■■■ **La recombinaison homologue chez les mammifères peut, comme chez la levure, être l'événement de recombinaison le plus fréquent.** Alors que la recombinaison homologue est le mode d'intégration le plus fréquent d'une séquence d'ADN introduite dans la levure, les expériences chez la souris ont indiqué, jusqu'à présent, que la fréquence des événements de recombinaison homologue ne représentait que de 1 pour 50 à 1 pour 1 000 des événements d'intégration au hasard (*m/s n° 3, vol. 8, p. 268*). Dans l'immense majorité des cas, cependant, les fragments d'ADN utilisés pour les expériences de recombinaison homologue avaient été isolés de banques génomiques fabriquées à partir d'autres lignées de souris que celles à laquelle appartiennent les cellules ES utilisées.

De ce fait, des variations relativement importantes peuvent exister entre l'ADN de la cellule ES et celui de la construction injectée, surtout en dehors des séquences codantes. Te Riele *et al.* (Amsterdam, Pays-Bas) ont montré que la recombinaison homologue dans le gène de susceptibilité au rétinoblastome pouvait devenir l'élément intégratif le plus fréquent lorsque l'on utilisait une construction d'ADN « isogénique », c'est-à-dire contenant des séquences identiques à celles du génome des cellules ES [1]. Dans ces conditions, 80 % des cellules ES transformées avec un fragment de 17 kb d'ADN ont subi un événement de recombinaison homologue, c'est-à-dire une proportion similaire à celle observée chez la levure. Si ces résultats peuvent être généralisés, le test par *knock out* de gènes deviendra le complément systématique de toute découverte de gènes nouveaux afin d'en préciser la fonction.

[1. Te Riele S, *et al., Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 5128-32.]

■■■ **La protéine p53, un facteur de transcription inactivé dans des cellules tumorales.** Le gène *p53* est un anti-oncogène qui code pour une protéine à laquelle on a prêté de nombreuses propriétés pouvant expliquer son pouvoir anti-oncogénique (*m/s n° 8, vol. 6, p. 821*). En particulier, de nombreux travaux ont suggéré que *p53* est un facteur de transcription dont le pouvoir transactivateur est perdu en cas de mutations associées à des cancers. S.E. Kern *et al.*, du laboratoire de Bert Vogelstein (Baltimore, MD, USA), viennent maintenant de prouver qu'existait effectivement une corrélation étroite entre les mutations oncogéniques de *p53* et la perte de son pouvoir de transactivation. En 1991, la même équipe a rapporté une séquence cible d'ADN capable de fixer, *in vitro*, la protéine p53 [1] et, un peu plus tard, a proposé le consensus 5' Pu Pu Pu (A/T) (T/A) G Py Py Py 3' pour le site de fixation (Pu = purines ; Py = pyrimidine) [2]. Maintenant, ces auteurs ont fabriqué une construction

génétique dans laquelle un gène test est contrôlé par plusieurs répétitions de ce site de fixation de *p53* [3]. Dans des cellules tumorales humaines aussi bien que dans un système de levures, la synthèse de la protéine *p53* aboutit à une stimulation importante de la transcription du gène test. En revanche, des protéines *p53* mutantes dérivées de cancers humains ont perdu la totalité de ce pouvoir transactivateur. De plus, ces protéines mutantes sont capables d'inhiber la transactivation du gène test par la protéine *p53* sauvage, probablement par formation de complexes multimoléculaires totalement ou partiellement inactifs. Ces résultats sont à rapprocher de ceux montrant que *p53* pouvait inhiber la transcription d'oncogènes (*m/s n° 2, vol. 8, p. 184*). Dans ce dernier cas, cependant, les auteurs n'indiquaient pas si l'inhibition observée était la conséquence d'un effet direct, liée à la fixation de *p53* à proximité du promoteur, ou indirect. Quoi qu'il en soit, *p53* semble ainsi capable de stimuler certains gènes, par un effet direct, et d'en inhiber d'autres. Reste maintenant à déterminer la nature des gènes qui, dans la cellule, sont positivement contrôlés par *p53* : ce pourrait être là le moyen d'identifier de nouveaux inhibiteurs de la prolifération cellulaire. [1. Kern SE, *et al. Science* 1991 ; 252 : 1708-12.] [2. El-Deiry WS, *et al. Nature Genet* 1992 ; 1 : 45-9.] [3. Kern SE, *et al. Science* 1992 ; 256 : 827-30.]

■■■ **Prévention d'un diabète auto-immun génétique par greffe intra-thymique d'îlots de Langerhans.** Nous rapportons, à la fin des années 1990, que l'on pouvait induire la tolérance à des greffes allogéniques en les faisant précéder de l'implantation dans le thymus du receveur de fragments tissulaires provenant du donneur. Préparés de cette manière, des animaux diabétiques pouvaient être guéris à long terme par une greffe d'îlots de Langerhans allogéniques (*m/s n° 10, vol. 6, p. 1014*). Posselt *et al.* (Philadelphie, PA, USA) [1] montrent maintenant que la greffe à

la naissance d'îlots de Langerhans compatibles dans le thymus de rat BB (*BioBreeding*) prévient le développement, chez ces animaux, d'un diabète secondaire à une agression auto-immune du pancréas ; ces lésions sont, en revanche, observées chez les animaux d'une même portée n'ayant reçu qu'une injection témoin dans leur thymus. A terme, l'effet persiste après ablation du thymus, ce qui signifie que le résultat n'est pas lié à l'activité des cellules pancréatiques endocrines intra-thymiques. En fait, l'implantation d'îlots de Langerhans dans le thymus de nouveau-nés informe probablement les thymocytes que les antigènes pancréatiques, cibles de la maladie diabétique auto-immune, font partie de soi. On ne sait pas si l'effet obtenu est lié à une délétion clonale des thymocytes auto-réactifs ou bien à l'induction d'une population de cellules T suppressives. Malgré leur caractère expérimental, difficile à appliquer directement à l'homme, ces résultats permettent de renforcer l'espoir qu'il sera possible de s'opposer aux maladies auto-immunes par une modulation spécifique de l'immunité.

[1. Posselt AM, *et al. Science* 1992 ; 256 : 1321-4.]

■■■ **Les mutations constitutionnelles du gène *p53* sont plus fréquentes que ne le laisserait croire le caractère exceptionnel du syndrome de Li Fraumeni.** Chez l'homme, le gène et la protéine *p53* sont modifiés dans 100 % des cancers à petites cellules du poumon, dans 70 % des cancers du côlon et dans près de 50 % des cancers du sein. Le syndrome de Li Fraumeni est une maladie exceptionnelle caractérisée par une prédisposition à des cancers multiples, dus à une mutation constitutionnelle du gène *p53* (*m/s n° 10, vol. 6, p. 1006*). Deux études publiées dans le numéro du 14 mai du *New England Journal of Medicine* montrent maintenant que la mutation germinale du gène *p53* peut être un facteur de prédisposition au développement de cancers, même dans des cas sans histoire familiale de maladie de Li Fraumeni. Une équipe nippo-américaine [1] a observé huit

mutations de ce type chez 180 malades atteints de sarcomes. Dans cinq cas existait une incidence élevée de cancers familiaux, notamment d'ostéosarcomes. L'autre étude, fruit d'une coopération entre des chercheurs américains et norvégiens [2], porte sur des enfants ou des adultes jeunes ayant eu deux cancers indépendants : sur 59 cas étudiés, quatre mutations germinales furent notées. Certaines de ces mutations sont équivalentes à des lésions déjà décrites dans certains cancers ; cependant, une mutation du neuvième exon est décrite pour la première fois, et sa responsabilité devra être confirmée par des études ultérieures. Ces études indiquent aussi que certains membres des familles de malades, porteurs de la mutation, n'ont pas encore développé de cancer à un âge déjà avancé. Rien n'est connu des facteurs responsables de l'expression phénotypique des mutations constitutionnelles de *p53* : syndrome de Li Fraumeni complet, susceptibilité à certains cancers ou absence de symptomatologie. La nature des mutations peut probablement être impliquée puisque, par exemple, des changements qualitatifs conférant à *p53* des propriétés oncogéniques ont des conséquences probablement plus sévères qu'une simple anomalie qualitative, comme cela est bien suggéré par les souris déficientes hétérozygotes en *p53* (*m/s n° 5, vol. 8, p. 492*). Une coopération avec d'autres gènes peut également être évoquée, selon le schéma illustré par le modificateur de l'expression phénotypique de la mutation *Min*, équivalent murin de la polyadénomatoose colique familiale (*m/s n° 6, vol. 8, p. 607*). A noter que d'autres études très larges, faites sur des cancéreux adultes tout venant, n'ont pas retrouvé de mutations germinales de *p53*. Une telle lésion doit donc être recherchée dans des circonstances particulières, une histoire familiale évocatrice ou des sujets jeunes développant plusieurs cancers, notamment des sarcomes.

[1. Toguchida J, *et al. N Engl J Med* 1992 ; 326 : 1301-8.]

[2. Malkin N, *et al. N Engl J Med* 1992 ; 326 : 1309-15.]

■■■■ Le ou les ligands du produit de l'oncogène *erb B2*. L'oncogène *erb B2*, encore appelé *HER2* ou, plus anciennement, *neu*, code pour une protéine transmembranaire de 185 kDa qui a toutes les caractéristiques d'un récepteur doté d'une activité de tyrosine kinase. Cependant, le ligand présomptif de ce récepteur n'était, jusqu'à ces derniers mois, pas connu. L'intérêt pour *erb B2* est justifié par la corrélation établie par plusieurs équipes entre l'amplification de ce gène, associée d'ailleurs à une mutation, et le mauvais pronostic des cancers mammaires. Après plusieurs caractérisations partielles de protéines pouvant se lier au produit de l'oncogène *erb B2*, deux équipes, l'une de Genentech (San Francisco, CA, USA) et l'autre associant des chercheurs du Weizmann Institute (Rehovot, Israël) à la firme Amgen (Thousand Oaks, CA, USA) viennent maintenant d'isoler une protéine de 45 kDa qui est un ligand [1, 3] et un activateur [1] de la protéine Erb B2. Les ADN complémentaires clonés chez l'homme et le rat par les deux équipes sont homologues. Il existe, en réalité, une famille d'ADN complémentaires codant tous pour des protéines ayant de fortes analogies, appartenant à la famille de l'EGF. Cependant, ce ligand, dénommé héréguline par l'équipe de Genentech, ne se fixe pas au récepteur d'EGF. Il s'agit de protéines de 228 à 241 acides aminés, ce qui correspond à 26 kDa ; le poids moléculaire de 45 000 noté par les équipes indique, par conséquent, que cette protéine est fortement glycosylée. Les différentes hérégulines diffèrent les unes des autres par la séquence variable d'un peptide de 19 à 26 acides aminés commençant à la position 212. Les protéines purifiées ou produites par génie génétique se fixent au récepteur Erb2 avec une constante de dissociation de l'ordre de 1.10^{-10} M et, selon l'équipe de Genentech, active son autophosphorylation sur des tyrosines [1]. Cette autophosphorylation pourrait être associée à une stimulation observée de la prolifération de cellules de cancers mam-

maires traitées *ex vivo* par l'héréguline. En contradiction apparente avec les résultats de Holmes *et al.* [1], Peles *et al.* ont cependant noté que la glycoprotéine-ligand pouvait se comporter comme un inducteur de la différenciation de cellules mammaires en culture [2], et non comme un facteur de croissance. Ces auteurs l'ont ainsi dénommée « NDF » (*neu differentiation factor*). Ces différences sont probablement plus apparentes que réelles ; elles pourraient refléter les conditions précises de culture et la dose du ligand ajoutée. L'équipe israélo-américaine montre, par ailleurs, que la transfection de cellules par l'oncogène *ras* activé augmente considérablement la synthèse de NDF [3]. La participation, exclusive dans le premier cas et importante dans le second, de grandes firmes privées de génie génétique à ces travaux indique bien le potentiel intérêt thérapeutique de cette découverte. Les efforts de ces firmes vont maintenant, très probablement, être consacrés à l'étude des relations structure/fonction de ces ligands et à la recherche d'antagonistes actifs, spécifiques et biodisponibles.

[1. Holmes WE, *et al.* *Science* 1992 ; 256 : 1205-10.]

[2. Peles E, *et al.* *Cell* 1992 ; 69 : 205-16.]

[3. Wen D, *et al.* *Cell* 1992 ; 69 : 559-72.]

■■■■ Le bunker des lymphocytes B auto-réactifs. *médecine/sciences* a très récemment rapporté l'expérience du laboratoire de T. Honjo, Kyoto, Japon, consistant à créer un modèle d'anémie hémolytique auto-immune chez des souris exprimant des auto-anticorps anti-érythrocytes (*m/s n° 4, vol. 8, p. 393*). Dans un plus récent article, M. Murakami *et al.* [1], du même laboratoire, précisent la nature des cellules autoréactives. En effet, le phénomène de tolérance immunitaire aurait dû entraîner, selon le schéma classique, l'élimination des lympho-

cytes B autoréactifs au cours du développement, ou au moins leur inactivation (anergie). De fait, les souris transgéniques ayant une hémolyse auto-immune sont très appauvries en lymphocytes B circulants, spléniques et ganglionnaires. Cependant, quelques rares lymphocytes B particuliers, de phénotype Ly-1⁺B, sont trouvés dans le péritoine des animaux nouveau-nés ; leur nombre augmente ensuite pour atteindre une concentration normale à l'âge adulte. Ce sont ces lymphocytes qui semblent sécréter les anticorps et sont donc à l'origine de l'anémie hémolytique. Deux mécanismes pourraient hypothétiquement expliquer que ces lymphocytes n'aient pas été éliminés au cours du développement alors qu'ils sont spécifiques d'un auto-antigène : soit il s'agit d'une population résistant intrinsèquement à l'élimination ou à l'inactivation en cas de rencontre d'un auto-antigène, soit le péritoine constitue pour eux un site privilégié dans lequel ils sont à l'abri de la rencontre avec l'auto-antigène. L'équipe japonaise a démontré que cette dernière hypothèse était exacte : l'injection de globules rouges dans le péritoine de ces souris entraîne l'induction d'une mort cellulaire par apoptose des lymphocytes B péritonéaux et, après répétition de ces injections, une correction progressive de l'anémie hémolytique. C'est donc bien en évitant tout contact avec l'antigène que cette population, appelée maintenant B1, a échappé à l'élimination frappant normalement les cellules autoréactives. L'apport de cet antigène dans le site protégé où se trouvent les lymphocytes B1 reste, cependant, susceptible d'induire leur élimination. On ne sait pas, à ce jour, si cette classe particulière de lymphocytes appartient à une lignée différente de celle des lymphocytes B habituels, ou bien si elle a acquis des caractéristiques phénotypiques particulières du fait de sa présence prolongée dans le micro-environnement péritonéal.

[1. Murakami M, *et al.* *Nature* 1992 ; 357 : 77-80.]

■■■ **L'interconnexion du réseau des cytokines précisée par recombinaison homologue.** Au début de l'année 1992 s'est tenue, en Californie, une conférence sur les cytokines au cours de laquelle ont été détaillés ou rapportés pour la première fois les effets de l'inactivation par recombinaison homologue (*knock-out*) des gènes codant pour les interleukines 2, 4 et 10. On distingue deux types de clones de lymphocytes T, Th1 et Th2. Th1 sécrète de l'IL-2 et de l'interféron γ (IFN- γ) alors que Th2 sécrète de l'IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10. Les souris IL-2^{-/-} n'ont pas, à première vue, de très importants désordres immunitaires lorsqu'elles sont jeunes mais développent fréquemment une lymphadénopathie et une splénomégalie faites de cellules B immatures et de granulocytes. Ces animaux meurent avant le sixième mois, de cause encore mal définie. Une importante anomalie biologique est l'hyperproduction des lymphokines IL-4, IL-6 et IL-10 lors de stimulation *in vitro* des lymphocytes T. La production d'immunoglobulines IgG1 et IgE dépend de l'IL-4. Ces deux isotypes d'immunoglobulines ont une concentration considérablement élevée chez les souris déficientes en IL-2. En revanche, comme on pouvait s'y attendre, IgG1 et IgE sont pratiquement indétectables chez les souris IL-4^{-/-}. Ces derniers animaux sont incapables de synthétiser des IgE même après infection parasitaire (par des nématodes). Ces deux types de résultats confirment par conséquent le rôle précédemment déterminé de l'IL-4 et indiquent que IL-2 et IL-4 peuvent avoir une influence sur l'équilibre entre les cellules de types Th1 et Th2. L'interleukine 10, sécrétée par les lymphocytes Th2, est, comme son numéro d'ordre l'indique,

de découverte plus récente que l'IL-2 et l'IL-4 et a été impliquée, comme cela est fréquent pour des cytokines, dans un nombre impressionnant d'effets physiologiques. Notamment, l'injection d'un anticorps anti-IL-10 à la naissance d'un souriceau entraîne une très importante réduction de la concentration des immunoglobulines IgM sériques et l'élimination des lymphocytes B CD5⁺ qui en sont la principale source. Cependant, les souris IL-10^{-/-} ont une concentration d'IgM normale. Elles sont de petite taille et meurent précocement de cause inconnue. W.E. Paul, qui rapporte dans *Nature* les résultats du congrès sur les cytokines [1], attend avec impatience, comme probablement de nombreux lecteurs, une exploration systématique de la susceptibilité de ces différents types de souris à des pathogènes variés — viraux, parasitaires et bactériens — afin de préciser la contribution des différentes cytokines au processus de défense anti-infectieuse. De la même manière, la tolérance des souris IL-2 au développement de cancers, endogènes ou greffés, sera particulièrement intéressante compte tenu du rôle de l'IL-2 dans l'activation des cellules NK (*natural killer*) qui sont probablement impliquées dans la défense anti-tumorale.

[1. Paul WE. *Nature* 1992 ; 357 : 16-7.]

■■■ **Un modèle de forme infantile de maladie de Gaucher chez des souris transgéniques.** La maladie de Gaucher, secondaire à un déficit en glucocérébrosidase, est une maladie de surcharge lysosomiale dont il existe plusieurs formes de symptomatologies et de gravités différentes. La forme habituelle est caractérisée par une très volumineuse splénomégalie

et d'importants troubles osseux, secondaires à l'accumulation dans ces tissus, de macrophages bourrés de glucocérébrosides non dégradés. Une forme infantile fulminante entraînant la mort peu après la naissance dans un tableau d'encéphalite a été également décrite. Il est hautement probable que ces différents tableaux cliniques sont reliés à l'activité résiduelle de la glucocérébrosidase, un déficit complet entraînant une surcharge dans les macrophages cérébraux dès la naissance, et la mort rapide. Les souris transgéniques homozygotes pour une mutation insertionnelle du gène de la glucocérébrosidase, provoquée par recombinaison homologue, ont un tableau très proche de cette forme infantile fulminante avec troubles neurologiques, respiratoires et mort rapide. Une surcharge par des lipides lysosomiaux est notée dans les macrophages cérébraux, spléniques, hépatiques et osseux. Ces résultats ont été obtenus par une importante équipe de chercheurs américains de la côte Est [1] parmi lesquels des spécialistes de la thérapie génique. Compte tenu de la rapidité de l'évolution, les animaux créés ne sont probablement pas les meilleurs modèles possibles pour tester différentes approches thérapeutiques de la maladie de Gaucher : remplacement enzymatique, greffe cellulaire ou thérapie génique. La méthode de recombinaison homologue devrait, néanmoins, permettre d'obtenir dans le futur des mutations aux conséquences moins dramatiques, aboutissant à une diminution d'activité et, peut-être, à un tableau plus proche de celui de la forme juvénile ou adulte classique de la maladie de Gaucher.

[1. Tybulewicz VLJ, et al. *Nature* 1992 ; 357 : 407-10.]

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ Une protéine se fixant sur des séquences très spécifiques d'ADN ou d'ARN monobrin pourrait intervenir dans l'excision/épissage des transcrits primitifs et dans la transcription. L'équipe de G. Schütz (Heidelberg, Allemagne) vient d'isoler une protéine qui se fixe sur une séquence monobrin d'ADN appartenant au *enhancer* du gène de la tyrosine aminotransférase (TAT). Cette séquence semble très importante pour l'action du *enhancer* [1]. Une protéine de même type, dont l'ADNc a été récemment cloné par l'équipe de M. Zakin (Institut Pasteur de Paris) se fixe sur un motif du promoteur du gène de la transferrine [2]. La séquence du clone d'ADNc isolé par Brunel *et al.* [2] et la séquence protéique partielle de la protéine fractionnée par Jansen-Dürr *et al.* [1] sont pratiquement identiques à la séquence de la protéine PTB murine. PTB (*pyrimidine tract binding protein*) se fixe à la répétition de pyrimidine précédant les sites accepteurs d'épissage, en 3' des introns. On pense que cette protéine PTB interviendrait dans l'épissage. Ces résultats suggèrent qu'une même protéine pourrait être spécifique de séquences particulières d'ARN ou d'ADN monobrin. Quoique la fonction réelle de cette protéine n'ait été démontrée ni dans la transcription ni dans l'épissage, ces résultats en évoquent d'autres décrivant l'importance de semblables facteurs se fixant sur des éléments monobrin d'ADN dans des phénomènes de régulation transcriptionnelle [3]. Une telle action supposerait, naturellement, que les contraintes topologiques s'exerçant sur certaines régions régulatrices puissent entraîner une fusion locale de l'ADN nécessaire à la fixation de cette classe particulière de facteurs transcriptionnels.

- [1. Jansen-Dürr P, *et al. Nucleic Acids Res* 1992 ; 20 : 1243-9.]
 [2. Brunel F, *et al. Nucleic Acids Res* 1991 ; 19 : 5237-45.]
 [3. Gaillard C, Strauss F. *J Mol Biol* 1990 ; 215 : 245-55.]

■■■ L'ADN fractal. Les propriétés fractales sont celles d'un ensemble complexe dont la structure semble similaire à quelque échelle elle soit observée. Une super-structure de même type semble pouvoir être retrouvée dans l'ADN [1, 2]. Plusieurs équipes de chercheurs ont ainsi noté que des corrélations particulières existaient, sur de grande distance, entre les nucléotides. Entre d'autres termes, les bases présentes 1 000, 10 000 et 100 000 nucléotides après un résidu donné semblent n'être pas distribuées intégralement au hasard ; de plus, ces corrélations entre la nature de nucléotides à 1 000, 10 000 ou 100 000 paires de base de distance semblent conservées. Certaines observations semblent indiquer que cette supersymétrie de l'ADN est liée à la présence d'introns. La nature des corrélations pourrait enfin, être plus ou moins spécifique des espèces. Si toutes ces observations semblent bien significatives, leur signification reste tout à fait obscure. Le plus probable est qu'il s'agisse là de la conséquence du processus évolutif ayant abouti au brin d'ADN analysé aujourd'hui. En effet, toute structure complexe qui est l'aboutissement de l'évolution d'un module élémentaire originel doit conserver une symétrie, plus ou moins rompue par des phénomènes aléatoires intercurrents. En d'autres termes, une évolution des molécules d'ADN à partir de cellules ancestrales contenant une petite quantité d'informations a pu engendrer la cohérence à grande échelle dont nous discutons. On peut même faire l'hypothèse que la contrainte évolutive pour l'acquisition d'une fonction a été tellement forte au niveau des séquences codantes qu'elle a, en quelle sorte, effacé la symétrie fossile du module d'origine. Certains évoquent aussi la possibilité d'une contrainte inconnue, physique ou chimique, au processus répliatif.

A.K.

- [1. Peng CK *et al. Nature*, 1992 ; 356 : 168-70]
 [2. Amato I. *Nature*, 1992 ; 257 : 747]



Information communiquée
 par la
 Société Française de
 Génétique

FONDATION CALOUSTE
 GULBENKIAN
 Cours Avancés de Oeiras 1992
 29 Octobre - 6 Novembre 1992

OUTILS D'ANALYSE EN GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS ET ÉVOLUTION

- Organisateur : T.MEO (Paris)
 - Conférenciers ayant confirmé leur participation : M. AGUADE (Barcelona), B. GOODWIN (Milton Keynes), D. HARTL (St Louis/Boston), M.KREITMAN (Chicago), M. NEI (University Park), B. OHNO (City of Hope)

Thèmes : Ce cours comprendra exposés, discussions et exercices sur la génétique des populations, de *E. Coli* à l'homme, avec l'accent sur les méthodes d'analyse de données pour :

- la détection d'indicateurs de sélection
- la reconstruction de la dynamique des changements évolutifs au niveau moléculaire (acides nucléiques et protéines)
- la résolution de phénotypes complexes par la cartographie des gènes à effet quantitatif mais aussi sur les modèles courants de :
- la génétique évolutive du développement
- la formation des espèces

Format : Chaque enseignant disposera de deux demi-journées au minimum et restera disponible pendant deux jours ou plus.

Nombre de participants : limité à 25

Aucun droit d'inscription n'est demandé.

Possibilités d'hébergement et de restauration à prix modique sur demande.

Inscription :

Envoi **avant le 15 Octobre 1992** d'une brève présentation des travaux de recherche et d'un court C.V. du candidat à :

EAO
 Instituto Gulbenkian de
 Ciencia,
 Apartado 14
 2781 OEIRAS CODEX
 PORTUGAL
 FAX : 351 1 443 16 31
 Téléphone : 351 1 443 13 31