

L'asymétrie des mammifères...

Les principaux mécanismes présidant à la mise en place et au contrôle de l'axe gauche-droite sont de découverte récente et concernent essentiellement l'oiseau. Ainsi, les gènes *sonic hedgehog* et *cnr1* (*chick nodal related gene1*) sont exprimés de manière asymétrique au cours de la gastrulation du poulet [1]. En revanche, aucune asymétrie n'avait été notée jusqu'à présent dans l'expression des gènes ou la morphologie des tissus correspondants chez les mammifères. Et pourtant, nous sommes bien asymétriques ! Deux équipes américaines et une équipe japonaise rapportent, dans le même numéro de *Nature*, l'expression asymétrique de deux gènes codant pour des protéines de la superfamille des *TGFβ* (*transforming growth factor*) : le gène *Nodal* et le gène *Lefty* [2-4].

Le gène *Nodal* est requis pour la formation de la ligne primitive pendant la gastrulation. L'une des équipes a procédé à l'inactivation de ce gène en introduisant une séquence IRES (*internal ribosomal entry site*) liée à une cassette *LacZ*-néomycine dans le deuxième exon du gène [2]. La synthèse de la β-galactosidase chez les hétérozygotes, qui présentent par ailleurs un phénotype normal, reflète donc l'expression normale du gène *Nodal*. Dès la formation des somites, le marquage bleu devient asymétrique avec une coloration plus intense à gauche du nœud. Au stade 3-4 somites, l'expression est confinée à une sous-population du mésoderme latéral au niveau de ce qui deviendra la partie gauche de l'embryon. Ces cellules s'étendent antérieurement à la ligne primitive jusqu'à une position coïncidant avec la région caudale du tube cardiaque. Cette distribution asymétrique de *Nodal* précède la rotation du cœur et

celle de l'axe de l'embryon et persiste jusqu'au stade 12-14 somites. L'étude par hybridation *in situ* de l'expression normale du gène *Nodal* par la seconde équipe montre un résultat à peu près équivalent : une asymétrie notée dès le stade 2-3 somites avec une expression plus marquée à gauche du nœud mais, contrairement à ce qu'observe l'équipe précédente, une disparition de l'asymétrie au stade 9-10 somites [3].

Il existe deux mutations murines principales causant un *situs inversus* (ou inversion de localisation de tous les organes asymétriques) et dont l'étiologie moléculaire n'est pas connue. L'une d'entre elles, la mutation *inv* (*inversion of embryonic turning*), est une mutation létale à l'état homozygote pour laquelle tous les animaux homozygotes développent un *situs inversus*. Lorsque des hétérozygotes pour la mutation *inv* et l'allèle *Nodal-LacZ* sont croisés à des

hétérozygotes *inv/+*, 20 % des animaux de génotype probablement *Inv/Inv; Nodal-LacZ^{-/-}* présentent une inversion de l'axe de rotation observée à 8 jours de développement *in utero*. Chez ceux-ci, le marquage est confiné à la future partie droite de l'embryon. Il existe donc bien une corrélation étroite entre la latéralisation de l'expression du gène *Nodal* et le sens de rotation de l'embryon. Afin de déterminer si *Hnf3β*, facteur de transcription essentiel pour la gastrulation et la formation du nœud chez la souris (*m/s* n° 1, vol. 11, p. 134), était également impliqué dans la formation de l'axe droite-gauche chez les mammifères, les auteurs ont croisé des souris hétérozygotes pour une mutation nulle du gène *Hnf3β* à des doubles hétérozygotes *Hnf3β^{-/-}; Nodal-lacZ^{+/-}*. Alors que les homozygotes *Hnf3β^{-/-}*, hétérozygotes pour l'allèle *Nodal-LacZ* ne l'expriment pas du tout, les doubles hétérozygotes pour la mutation d'un

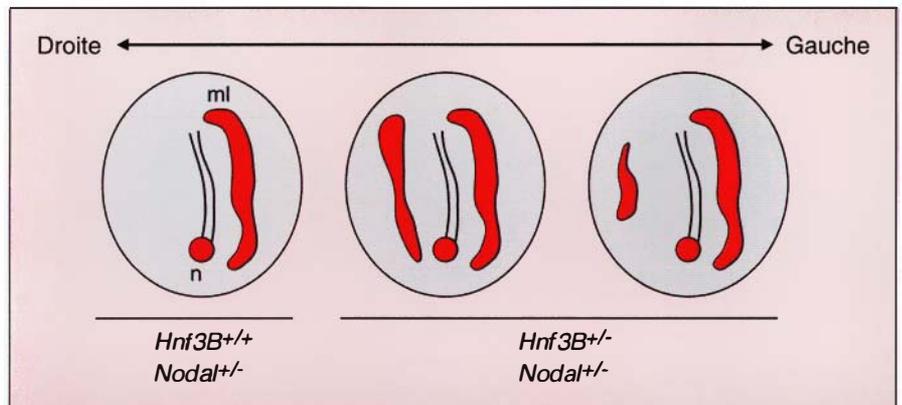


Figure 1. Représentation schématique de l'expression de la β-galactosidase, reflet de l'expression de *Nodal*, dans des embryons *Nodal-LacZ^{+/-}* homozygotes *Hnf3B^{+/+}* ou hétérozygotes *Hnf3B^{+/-}*. Vue postérieure d'embryons au stade 8 à 12 somites. L'expression, représentée en rouge, est latéralisée à gauche pour les embryons *Hnf3B^{+/+}* et est bilatérale pour les embryons *Hnf3B^{+/-}*. ml : mésoderme latéral ; n : nœud.

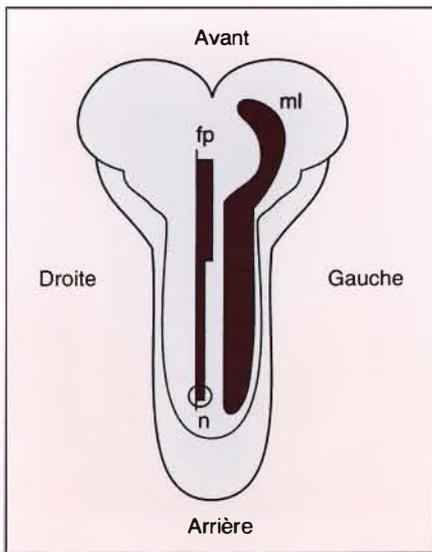


Figure 2. **Représentation schématique de l'expression du gène Lefty sur une vue ventrale d'embryons normaux de souris de 8 jours p.c. (post-coïtum).** Les zones d'expression du gène Lefty sont représentées en bistre. fp: futur plancher ou floorplate; ml: mésoderme latéral; n: nœud.

allèle *Hnf3B* et pour l'allèle *Nodal-LacZ* montrent une expression bilatérale de *LacZ* (figure 1). Ceux d'entre eux qui expriment *LacZ* de façon équivalente à gauche et à droite ont une latéralisation aléatoire (c'est-à-dire soit normale, soit inversée) et toujours retardée. Les protéines *Hnf3B* et *Nodal* semblent donc coopérer dans l'établissement de l'asymétrie droite-gauche. C'est en recherchant de façon systématique des séquences exprimées spécifiques de cellules de carcinome embryonnaire que l'équipe japonaise [4] a mis en évidence une nouvelle protéine de la famille des TGF β (20 % à 25 % de similitude seulement) dépourvue d'une cystéine nécessaire à la dimérisation. L'expression de ce nouveau transcrite apparaît à 6,5 jours p.c. (post-coïtum) dans la moitié antérieure de la ligne primitive. A 8 jours, à un stade où l'embryon a seulement trois ou quatre paires de somites, l'expression devient asymétrique dans le futur plancher ainsi que dans le mésoderme latéral, uniquement détectable du côté gauche (figure 2). Elle n'est pas retrouvée dans les cellules déterminées à former le cœur.

L'expression disparaît au stade 6-8 somites. Ce nouveau gène a donc été appelé *Lefty*. L'analyse des mutants murins *inv/inv* et *iv/iv* (*situs inversus viscerum*) révèle une expression inversée de *Lefty*. Ce gène n'est cependant probablement pas impliqué dans la détermination de l'axe droite-gauche qui a lieu avant le stade somitique chez les mammifères (donc à un stade où *Lefty* n'est pas encore exprimé *a priori*). Son expression asymétrique dans le tube neural permet, en revanche, de supposer son implication dans certaines asymétries du système nerveux central.

H.G.

1. Concordet JP. Asymétries gauche-droite chez les vertébrés. *Med Sci* 1996; 12: 192-6.
2. Collignon J, Varlet I, Robertson E. Relationship between asymmetric *nodal* expression and the direction of embryonic turning. *Nature* 1996; 381: 155-8.
3. Lowe L, Supp D, Sampath K, Yokoyama T, Wright C, Potter S, Overbeek P, Kuehn M. Conserved left-right asymmetry of *nodal* expression and alterations in murine *situs inversus*. *Nature* 1996; 381: 158-61.
4. Meno C, Saijoh Y, Fujii H, Ikeda M, Yokoyama T, Yokohama M, Toyoda Y, Hamada H. Left-right asymmetric expression of the TGF β -family member *lefty* in mouse embryos. *Nature* 1996; 381: 151-5.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ Le gène *msg1* s'exprime quand le mélanocyte est pigmenté... et *vice versa* ! La pigmentation est une caractéristique des mélanocytes, la dépigmentation un indice de malignité. Identifier le/les gènes impliqués spécifiquement dans cette fonction mélanocytaire est un enjeu important pour la compréhension de ce phénomène. Cet objectif est aujourd'hui en voie de réalisation grâce à la découverte d'un nouveau gène baptisé *msg1* (*melanocyte-specific gene*). Elle est le fruit d'une recherche fondée sur l'expression différentielle de gènes dans deux lignées de mélanomes murins fortement et faiblement pigmentés [1]. De nombreux éléments militent en faveur d'une relation fonctionnelle directe entre *msg1* et la pigmentation. (1) Chez la souris, l'expression

des transcrits *msg1* est tout à fait spécifique des mélanocytes. (2) Il existe une étroite corrélation entre la quantité de transcrits *msg1* et le degré de pigmentation des cellules mélanocytaires en culture. (3) Le transcrite *msg1*, qui existe sous une majoritaire de 1 kb et une forme minoritaire de 1,3 kb, est présent, chez l'homme, uniquement dans les mélanocytes normaux pigmentés, absent des mélanomes pigmentés. (4) La transformation de cellules mélanocytaires pigmentées par un oncogène induit leur dépigmentation et la perte de l'expression du transcrite *msg1*. Si le gène *msg1* code pour un polypeptide de 203 acides aminés sans analogie avec d'autres protéines connues chez la souris, chez l'homme, deux gènes voisins de *msg1*, codant pour des protéines

inconnues ont été identifiés. L'un d'eux, le gène *MSG1*, exprimé dans les mélanocytes humains normaux mais non tumoraux, code pour une protéine ayant 75 % d'identité avec la protéine murine. (5) Dans les mélanocytes normaux humains et les différentes lignées murines étudiées, la synthèse de la protéine *Msg1* de 27 kDa, évaluée à l'aide d'un anticorps spécifique, est tout à fait corrélée à celle du transcrite. En outre, sa localisation est essentiellement intranucléaire. La protéine *Msg1* semble ainsi être la première protéine nucléaire très spécifique du mélanocyte. Est-elle un facteur de différenciation et de transcription essentiel à la cellule mélanocytaire ?

[1. Shioda T, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12298-303.]

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **MITF, un facteur de détermination mélanogénique.** Le gène *MITF* (*microphthalmia-associated transcription factor*) code pour un facteur de transcription appartenant à la famille bHLH-LZ (*basic-helix-loop-helix-leucine-zipper*). Les souris homozygotes pour la mutation *microphthalmia* (*mi*) ont un phénotype caractérisé par un défaut pigmentaire (pelage blanc, anomalies de la pigmentation de l'iris) une microphthalmie et un défaut auditif. Ces syndromes correspondent bien à ceux que l'on attend d'un désordre du développement des mélanocytes. Le gène *mi* semble donc être essentiel à la différenciation mélanocytaire chez la souris. Chez l'homme, le syndrome de Waardenburg comporte plusieurs formes qui diffèrent par leurs phénotypes et le locus en cause. Les formes WS1 et WS3 sont liées à des mutations du gène *PAX3* (*m/s n° 4*, vol. 8, p. 393). En revanche, certaines formes WS2 sont associées à

une mutation du gène *MITF* (*m/s n° 1*, vol. 11, p. 133), l'homologue humain du gène murin *mi* [1]. Tachibana *et al.*, une équipe réunissant des chercheurs américains de Rockville, Bethesda (MD) et New York, et japonais de Tokyo, démontrent maintenant que la protéine MITF se comporte comme un véritable facteur de détermination de la différenciation mélanocytaire [2]. En effet, la transfection de fibroblastes murins à l'aide d'un vecteur d'expression commandant la synthèse du facteur MITF provoque la conversion de ces fibroblastes en cellules de phénotype mélanocytaire, avec aspect dendritique et synthèse de marqueurs mélanogéniques tels que la tyrosinase. Cependant, cet effet différenciateur de MITF dépend du type cellulaire et n'est pas observé avec d'autres lignées de cellules murines. MITF est également un transactivateur du gène de la tyrosinase. En revanche, les protéines mutées synthétisées

chez deux malades atteints de syndrome de Waardenburg de type 2 sont incapables de transactiver ce gène. Cette double action de différenciation cellulaire et de transactivation d'un gène caractéristique de l'état de différenciation induit est maintenant bien connue, particulièrement illustrée par les facteurs myogéniques de la famille MyoD. Cependant, ce gène *MITF* ne rend pas compte de tous les WS2. La découverte de nouveaux gènes en cause indiquera quels autres mécanismes que le déficit en facteur PAX3 et en MITF peuvent induire ce phénotype de surdité avec anomalie de la pigmentation et désordres oculaires caractéristiques du syndrome de Waardenburg.

[1. Tassabehji M, *et al. Nature Genet* 1994; 8: 1251-5.]

[2. Tachibana M, *et al. Nature Genet* 1996; 14: 50-4.]

• COLLÈGE DE FRANCE •

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE DE LA PERCEPTION ET DE L'ACTION

M. Alain Berthoz, Professeur
Année 1996-1997

COURS

LE CERVEAU ET L'ESPACE I. BASES NEURALES DE LA MÉMOIRE DES DÉPLACEMENTS

Les cours et séminaires auront lieu le **mardi de 16 heures à 18 heures 30**, dans la **salle 1**.

Deux cours et deux séminaires seront donnés au mois d'avril à l'Université de Pise - École Normale sur « **Le cerveau et l'espace: le problème des référentiels dans les transformations visuomotrices** ».

Calendrier des COURS et SÉMINAIRES

- 7 janvier, 16 h Cours 1
17 h Pr N. Burgess (*University College, Londres, UK*) The hippocampal formation and navigation in robots and humans.
- 14 janvier, 16 h Cours 2
17 h Pr E.T. Rolls (*Université d'Oxford, UK*) Space, Memory, and the primate hippocampus.
- 21 janvier, 16 h Cours 3
17 h Pr A. Étienne (*Université de Genève, CH*) La navigation chez l'animal: complémentarité entre différents types de références spatiales
- 28 janvier, 16 h Cours 4
17 h Pr B. Poucet (*Cnrs-Cnrc, Marseille*) La connaissance de l'espace chez l'animal: aspects comportementaux et neuronaux.
- 18 février, 16 h Cours 5
17 h Pr J. Paillard (*Cnrs-Nbm, Marseille*) Espace des lieux, espace de l'objet et espace du corps
- 25 février, 16 h Cours 6
17 h Pr J. O'Keefe (*University College, Londres, UK*) Cognitive maps and the hippocampal formation in animals.
- 4 mars, 16 h Cours 7
17 h Dr S. Wiener (*LPPA, Collège de France*) Neurones sélectifs pour la position et le comportement de l'animal au niveau du noyau accumbens (zone recevant les entrées hippocampiques).

L'Administrateur du Collège de France, André Miquel
Collège de France, 11, place Marcelin-Berthelot, 75005 Paris, France

Cancer

■■■ Des cibles de la protéine Myc.

L'oncogène *Myc* peut induire l'apoptose en l'absence de coopération avec des événements anti-apoptotiques ou co-inducteurs de prolifération (*m/s* n° 9, vol. 8, p. 1002). On sait que la protéine Myc agit dans la cellule sous la forme d'un hétérodimère avec la protéine Max, ces deux sous-unités appartenant à la famille des facteurs bHLH-LZ (*basic-helix-loop-helix-leucine-zipper*). Les éléments d'ADN reconnus par l'hétérodimère sont de type CACGTG. Cependant, les véritables cibles de l'action physiologique de Myc ne sont pas encore connues avec précision. C'est dire l'importance de la description récente de deux cibles dont la nature indique comment elles pourraient relayer l'action de Myc. L'équipe de David Beach (New York, USA) montre que le gène codant pour la protéine phosphatase Cdc25A a sa transcription activée par la protéine c-Myc [1]. Cette phosphatase est un activateur des kinases liées au cycle cellulaire (complexes Cdk), notamment du complexe entre la cycline E et Cdk2. Il est probable que Cdc25A intervienne en déphosphorylant la thréonine 14 ou la tyrosine 15 de la kinase Cdk2. De ce fait, cette phosphatase est indispensable à la progression dans le cycle cellulaire et, d'ailleurs, son activité est stimulée par le sérum et les facteurs de croissance. Cependant, Cdc25A peut également intervenir dans le déclenchement de l'apoptose : l'inhibition de sa synthèse par un ARN anti-sens protège des cellules en culture de ce type de mort programmée. Il existe trois sites potentiels de fixation du complexe Myc/Max dans le promoteur du gène *Cdc25A*. De son côté, l'équipe de Robert Eisenman (Seattle, WA, USA) a isolé une cible potentielle, jusqu'alors inconnue, en utilisant une laborieuse et très

intéressante méthode. Celle-ci repose sur la purification de fragments de chromatine à l'aide d'anticorps reconnaissant les protéines Myc et Max [2]. Le but est ici d'isoler des gènes à proximité desquels le complexe Myc/Max est fixé *in vivo*. L'un de ces gènes code pour une protéine MrDb, qui possède un motif DEAD (Asp, Glu, Ala, Asp), caractéristique des hélicases de l'ARN. Le gène correspondant est induit lors de la stimulation de la prolifération de cellules par le sérum ou les facteurs de croissance, et par la protéine Myc. Ici, cependant, les relations entre cette protéine MrDb et les effets de Myc sont moins évidents que dans le cas de Cdc25A. On ne peut que spéculer sur l'éventuelle stabilisation (ou activation traductionnelle) par la protéine MrDb d'ARN messagers codant pour des facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire. Cependant, la méthode utilisée d'immunoprécipitation de fragments de chromatine active est potentiellement extrêmement puissante pour isoler des gènes réellement contrôlés *in vivo* par des facteurs de transcription donnés. Ces deux articles laissent espérer que s'éclaire enfin, dix-sept ans après la découverte de l'oncogène *c-Myc*, le mode d'action de l'un des premiers « gènes de cancer » étudiés.

[1. Galaktionov K, *et al. Nature*. 1996; 382: 511-17.]

[2. Grandori C, *et al. EMBO J* 1996; 15: 4344-57.]

■■■ L'effet carcinogène du tabac : mutations identiques du gène *P53* par action du benzo[a]pyrène et dans les cancers bronchiques des fumeurs. Dans une nouvelle parue en 1992, nous indiquions l'intérêt de la protéine *p53* pour explorer la nature des facteurs oncogéniques dans l'environnement (*m/s* n° 3, vol. 8, p. 289); nous concluons particulièrement en indiquant que cette méthode permettrait probablement d'établir une corrélation entre la

carencese due à certains toxiques, tel le tabac, et des mutations particulières de *P53*. Cette prévision vient d'être confirmée par un article de Denissenko *et al.* (Duarte, CA, et Smithville, TX, USA). Ces auteurs observent qu'une carcinogenèse expérimentale par le Benzo[a]pyrène diol epoxyde intéresse particulièrement les guanines 157, 248 et 273 du gène *P53*. Or, ce sont là trois points chauds des mutations observées dans les cancers bronchiques qui se développent chez les fumeurs [1]. De plus, la majorité des mutations observées chez les malades sont des transversions de G vers T, ce qui est attendu pour une mutagenèse provoquée par l'addition de chaînes hydrocarbonnées aromatiques polycycliques.

[1. Denissenko MF, *et al. Science* 1996; 274: 430-2.]

Génétique

■■■ Le diagnostic prénatal précoce d'une mutation fait sur sang maternel. Le diagnostic prénatal des hémoglobinopathies est pratiqué depuis plus de 20 ans par diverses techniques. L'abord obstétrical employé a cependant deux inconvénients : un risque faible mais non négligeable pour le fœtus, le coût et la difficulté du prélèvement de trophoblastes. D'où l'intérêt des deux cas de diagnostic prénatal effectués sur sang maternel que présente le groupe de Y.W. Kan (San Francisco, CA, USA) [1]. L'existence de cellules fœtales dans le sang de la mère est connue depuis longtemps, et on l'a utilisée pour la mise en évidence d'anomalies chromosomiques ou la recherche d'un fœtus de sexe masculin. Leur purification insuffisante, la persistance éventuelle de lymphocytes fœtaux pendant des années, en a interdit l'usage pour le diagnostic de maladies monogéniques. Le processus employé par le groupe

de San Francisco est ingénieux, il repose sur des concepts simples et a pu être utilisé dès la huitième semaine de la grossesse. Après un premier enrichissement par gradient de densité, l'étape suivante est le tri cellulaire des érythroblastes, maternels et fœtaux, par des anticorps contre le récepteur de la transferrine fixés sur des billes magnétiques. Une technique d'immunofluorescence utilisant un anticorps contre la chaîne embryonnaire ζ identifie sur lame les cellules fœtales, et la dernière étape de purification est une microdissection des noyaux sous contrôle microscopique. Les auteurs ont ainsi obtenu entre 8 et 22 noyaux, transférés directement dans le tampon de PCR. Celle-ci est effectuée de façon prolongée (70 cycles), en amplifiant les deux allèles avec les mêmes amorces afin d'éviter un biais éventuel dû à l'amplification préférentielle d'un allèle [2]. Le résultat génotypique s'est avéré identique à celui des méthodes classiques et différait dans les deux cas entre la mère et le fœtus. En cas d'identité, on peut d'ailleurs envisager un contrôle par typage HLA sur les mêmes cellules. D'autres résultats doivent naturellement confirmer la fiabilité de cette méthode, précoce, non invasive et peu onéreuse, dont on peut penser qu'elle serait applicable à d'autres maladies monogéniques fréquentes.

[1. Cheung MC, *et al. Nature Genet* 1996; 14: 264-8.]

[2. Viville S, *et al. Med Sci* 1996; 12: 1378-88.]

■■■ **Nos potes les Gitans...** Bien que les Tsiganes constituent un important groupe humain, tant par leur nombre (estimé à plus de cinq millions de par le monde) que par leur culture, peu d'études génétiques ont été consacrées jusqu'à présent aux maladies récessives qui doivent exister dans cette population à forte endogamie. Même quand ils furent contraints d'aban-

donner le nomadisme, les Tsiganes furent souvent marginalisés au sein des populations dans lesquelles ils vivaient; aujourd'hui encore, ils ne bénéficient pas toujours pleinement des services de soins des pays dans lesquels ils séjournent. Leur point de départ, ainsi que l'origine de leurs langues se situeraient au nord de l'Inde et leur nom, *athsinganos*, en grec byzantin, signifierait «ne touche pas». Leur présence en Europe est mentionnée pour la première fois au XI^e siècle, dans les écrits d'un moine du mont Athos. Une neuropathie démyélinisante atteignant une communauté d'une centaine de personnes vivant à Lom, une petite ville au bord du Danube en Bulgarie, vient de faire l'objet d'une étude génétique [1]. Cette maladie se caractérise par un ralentissement de la vitesse de conduction nerveuse débutant dès la première décennie, évoluant vers une incapacité motrice avec aréflexie, atrophie musculaire et surdité. Par analyse de ségrégation, le locus a pu être situé en 8q24. Puis l'étude fut étendue à d'autres groupes, l'un originaire de Valachie (ancienne principauté danubienne) et parlant un dialecte différent, l'autre de religion musulmane et parlant le turc. L'analyse multipoint confirme une même localisation pour les trois communautés et l'étude des haplotypes révèle un déséquilibre de liaison, tous les malades étant homozygotes pour les marqueurs *D8S378* et *D8S529*. Étant donné l'absence apparente de liens récents entre ces trois groupes de Tsiganes (mais les différences de langues ou de religion ne peuvent constituer des preuves) et en raison des résultats de l'étude des recombinaisons d'un certain nombre de marqueurs polymorphes dans la région distale de l'haplotype (17 marqueurs furent étudiés), les auteurs supposent que la maladie a préexisté à l'implantation de ces populations dans les Balkans et que la mutation se serait produite il y a environ 800 ans. Il faudrait que les équipes australienne, anglaise, bulgare, espagnole

et grecque qui se sont associées pour réaliser cette étude recherchent cette neuropathie dans d'autres populations tsiganes que les Rom, chez des Manouches ou des Kalé par exemple, pour étayer leur hypothèse. Il leur restera ensuite à trouver un nouveau gène de myéline en 8q24. Cela n'est pas impossible: une neuropathie de Déjerine-Sottas, observée dans une famille américaine d'origine africaine et transmise en dominance cette fois, vient d'être cartographiée sur ce même locus [2], ce qui laisserait donc supposer deux types de mutations alléliques d'un même gène.

[1. Kalaydjieva L, *et al. Nature Genet* 1996; 14: 214-7.]

[2. Ionasescu VV, *et al. Muscle and Nerve* 1996; 19: 319-23.]

■■■ **Le collagène, partenaire de la dystrophine?** Les dystroglycanes sont des éléments importants du complexe dystrophine-glycoprotéine. Le rôle de l' α -dystroglycane est de lier la laminine au sein de la matrice extracellulaire (*m/s n° 10, vol. 7, p. 1090*). Dans la dystrophie musculaire congénitale avec absence de mérosine (qui est la laminine musculaire), des mutations du gène codant pour la sous-unité α de la laminine (*LAMA2*) sont observées [1, 2]. Bien qu'on ne connaisse pas encore le mécanisme initial de la mort de la cellule musculaire dans les dystrophinopathies, le lien entre cytosquelette et matrice extracellulaire semble essentiel pour stabiliser la membrane et protéger le sarcolemme des tensions produites par la contraction musculaire. Or, il apparaît que le collagène peut lui aussi être impliqué dans le processus myopathique: des mutations dans les gènes codant pour les chaînes α du collagène de type VI viennent en effet d'être observées dans une forme rare de myopathie, la myopathie de Bethlem. Cette dystrophie musculaire bénigne, dominante autosomique, ressemble à une myo-

pathie des ceintures mais s'accompagne de contractures articulaires. Une équipe hollandaise avait d'abord exclu une liaison avec la région 5q où se trouve le locus de la dystrophie musculaire autosomique LGMD1A et, en poursuivant ses analyses de ségrégation dans six familles, elle avait trouvé une liaison avec un locus en 21q22.3, où sont localisés les deux gènes *COL6A1* et *COL6A2* [3]. Le collagène de type VI n'avait encore jamais été impliqué dans une maladie humaine mais on savait par des études au microscope électronique qu'il était un composant des structures microfibrillaires de nombreux tissus et qu'il devait avoir une fonction d'ancrage [4]. Les mutations observées ségrégent avec la maladie dans les familles et aucun des sujets bien portants et des témoins étudiés n'en sont porteurs [5]. Ce sont des mutations faux sens perturbant le motif Gly-X-Y dans le domaine de la triple hélice [6], dans les protéines COLVIA1 et COLVIA2. En outre, dans une autre famille dans laquelle la maladie ne ségrége pas avec le locus en 21q22, le gène *COL6A3* est très probablement en cause car il existe une liaison avec la région 2q37 où il se situe. Bien que la myopathie de Bethlem soit une maladie rare et peu connue, sa pathogénie, avec l'implication des gènes *COL6A* dans un processus dystrophique, mérite toute notre attention car elle suggère que le tissu conjonctif de l'endomysium (gaine conjonctive entourant chaque fibre musculaire) participe à l'ancrage des fibres musculaires et que la rupture de la membrane basale pourrait être l'élément initial du processus dystrophique.

- [1. Duclos F, *et al. Med Sci* 1995; 11: 1732-8.]
 [2. Helbling-Leckler A, *et al. Nature Genet* 1995; 11: 216-8.]
 [3. Speer MC, *et al. Hum Mol Genet* 1996; 5: 1043-6.]
 [4. Engel J, *et al. Ann Acad Sci* 1985; 460: 25-37.]

[5. Jöpsis GJ, *et al. Nature Genet* 1996; 14: 113-5.]

[6. Van der Rest M. *Med Sci* 1987; 3: 411-20.]

■■■ **Comment une mutation du gène des récepteurs des androgènes suffit-elle à menacer le sexe mâle?**

L'intégrité du récepteur des androgènes est nécessaire à la différenciation sexuelle mâle. Cette affirmation est illustrée principalement par l'étude des syndromes d'insensibilité aux androgènes. Ces maladies héréditaires récessives liées à l'X se manifestent, dans le cas d'insensibilité complète aux androgènes, par la formation de testicules féminisants associée à un phénotype complètement féminin. Dans le cas d'insensibilité partielle aux androgènes, le phénotype est ambigu [1]. Comme d'autres récepteurs des stéroïdes, le récepteur des androgènes possède un domaine de liaison du ligand dans la région carboxy-terminale, un domaine de liaison à l'ADN, et, dans la région amino-terminale, un domaine de transactivation impliqué dans la dimérisation et la stabilisation du récepteur. C'est dans cette région du récepteur qu'une nouvelle mutation (Glu → Lys) à l'extrémité amino-terminale a été identifiée dans une famille atteinte d'insensibilité partielle aux androgènes (au niveau de trois générations au moins), mutation due à la substitution G → A au niveau du premier exon du gène codant pour le récepteur des androgènes [2]. Les conséquences fonctionnelles de cette nouvelle mutation du récepteur ont été analysées par expression transitoire du récepteur muté dans des cellules en culture (cellules Cos), et mesure de sa capacité de liaison. Alors que les récepteurs normaux et mutés ont la même affinité pour un ligand spécifique, une légère augmentation de la vitesse de dissociation du complexe ligand/récepteur est observée dans le cas du

récepteur muté. Plus spectaculaire, en revanche, est l'effet de la mutation sur l'activité transcriptionnelle du récepteur. Cette activité (mesurée après co-transfection avec un plasmide contenant un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur activé par les androgènes) est diminuée deux fois, tout comme l'est le niveau d'expression de la protéine mutée (estimé par immunomarquage). Ces altérations ne semblent pas liées à la quantité d'ARNm synthétisé, identique pour le récepteur muté et le récepteur normal. Enfin, l'efficacité relative de la traduction du message du récepteur muté est, elle aussi, deux fois plus faible, au moins au cours des dix premières minutes de synthèse de la protéine (dans une expérience de radiomarquage des protéines), la dégradation des récepteurs mutés et non mutés, étant par ailleurs tout à fait comparable. L'ensemble de ces observations indique clairement qu'une seule mutation au niveau du premier nucléotide en 3' du codon ATG affecte la traduction de la protéine récepteur. D'ailleurs, cette observation pouvait être attendue du fait de la très grande conservation d'une séquence consensus entourant les codons Met initiateur (^A/_CCCATGG) [3]. Cette mutation ayant pour effet de diminuer le nombre de récepteurs de 50 % suffit donc à rendre compte du phénotype d'insensibilité partielle aux androgènes observé dans la famille affectée, et confirme la notion qu'un seuil d'expression du récepteur des androgènes est essentiel à la différenciation sexuelle normale chez l'homme.

- [1. Sultan C, *et al. Med Sci* 1991; 7: 697-704.]
 [2. Choong CS, *et al. J Clin Invest* 1996; 98: 1423-31.]
 [3. Jean-Jean O, *et al. Med Sci* 1993; 9 (suppl. 11): SFG I-XI.]

■■■■ **Les diadénosine polyphosphates: seconds messagers du glucose?** On les appelle les « alarmones »; ces molécules formées de deux adénosines liées par une chaîne de trois à six phosphates, ubiquitaires et présentes à faible concentration dans la cellule, augmentent en cas de stress métabolique ou d'exposition aux oxydants. L'inhibition des canaux K^+ sensibles à l'ATP du muscle cardiaque, le contrôle du Ca^{2+} cytosolique dans les cellules musculaires vasculaires et du potentiel de membrane dans les cellules musculaires lisses des glomérules rénaux, sont quelques-unes des actions attribuées à ces petites molécules chimiques. Aujourd'hui, au moins dans la cellule β pancréatique sécrétrice d'insuline, c'est en tant que second messager du glucose (ce qui n'est pas

un moindre rôle!) que sont reconnues les diadénosine polyphosphates. Deux types de molécules, Ap_4A et Ap_3A , ont ainsi été identifiées et évaluées dans des cellules β pancréatiques de souris, leurs concentrations avoisinant respectivement 0,2 et 0,3mM dans des conditions d'incubation de glucose à faible concentration (3mM). Lorsque ces cellules sont traitées par le glucose (à 22 mM, concentration induisant la sécrétion d'insuline, et pendant 90 min), les concentrations cellulaires de Ap_4A et Ap_3A se trouvent augmentées respectivement de 70fois et 30 fois; le rapport ATP/ADP, quant à lui, est augmenté 6fois sous l'effet du glucose. Appliquées à la face interne de la membrane cellulaire, Ap_4A et Ap_3A inhibent fortement l'activité des canaux K^+ sensibles à l'ATP. Ap_4A et

Ap_3A sont actifs aux concentrations que l'on retrouve dans les cellules lors de leur exposition au glucose. Deux conclusions majeures peuvent être tirées de ces observations: (1) les diadénosine polyphosphates jouent probablement un rôle important dans la régulation de la sécrétion d'insuline par le glucose; (2) le statut du rapport ATP/ADP en tant que meilleur candidat comme second messager physiologique dans la relation métabolisme/ canaux K^+ est dorénavant fortement menacé par l'arrivée des diadénosine polyphosphates sur la scène. L'avenir nous dira si cette menace est réelle et s'étend à d'autres types cellulaires.

[1. Ripoll C, et al. *Diabetes* 1996; 45: 1431-4.]

FLASH

MUTATION À SATURATION CHEZ LE POISSON ZÈBRE

Le prix Nobel 1995 a été décerné à Christiane Nüsslein-Volhard et à Eric Wieschaus, notamment pour leurs travaux, datant du début des années 1970, sur le criblage de nombreuses mutations provoquées chez la drosophile, capables de perturber son développement [1]. On sait quel rôle fondamental a joué la création par Nüsslein-Volhard et par Wieschaus de ces milliers de mutants dans la compréhension des mécanismes du développement, non seulement des insectes, mais aussi des vertébrés. Cependant, les vertébrés possèdent de nombreuses structures originales dont il n'existe pas l'équivalent chez les insectes, si bien que les mécanismes de leur morphogenèse ne peuvent être déduits des travaux réalisés chez la drosophile. C'est la raison pour laquelle Christiane Nüsslein-Volhard et l'un de ses collaborateurs, Wolfgang Driever, respectivement à Tübingen en Allemagne et à Boston aux États-Unis, ont réalisé chez le poisson zèbre, un vertébré constituant un excellent modèle de développement dont nous avons déjà parlé [2], une mutagenèse à saturation suivie d'un criblage extensif et intensif des mutants obtenus. L'opération a véritablement été industrielle: Nüsslein-Volhard a installé, dans son laboratoire, environ 6000 aquariums de tailles variées disposant de toutes les conditions sanitaires nécessaires et pouvant accueillir 350000 poissons! Des mâles ont été exposés à un mutagène chimique, puis croisés à des femelles normales. Les descendants F1, comportant des individus hétérozygotes pour des mutations, ont été croisés entre eux, aboutissant à des embryons F2 dont le développement a été observé, en Allemagne, par une équipe d'une douzaine

*de personnes travaillant de 60 à 70 heures par semaine pendant près d'une année. Ont été sélectionnées des mutations précoces, intervenant notamment à partir de la gastrulation. Plus de 1 800 nouveaux mutants ont ainsi été observés, dont la description occupe un volume entier de la revue *Development* (livraison de décembre 1996) [3, 4]. Les noms des mutants ont été choisis selon l'inspiration du moment, et comportent souvent un clin d'œil ironique ou humoristique, comme cela est, en fait, la règle dans la désignation des mutants de développement chez la drosophile: on trouve ainsi des mutations bouillabaisse, chardonnay, sleepy, doc, space cadet, etc. Outre les anomalies de la gastrulation, des désordres dans le développement de la notochorde, des muscles, des oreilles, du cerveau, du cœur et du sang ont ainsi été identifiés. De plus, des anomalies des circuits neuronaux ont ainsi été obtenues. Reste maintenant, naturellement, à cloner les quelque 500 gènes responsables de toutes les mutations décrites, tel que le nombre en a été apprécié par des tests de complémentation consistant à croiser des animaux hétérozygotes provenant de progénies différentes [5]! De quoi occuper plusieurs dizaines de laboratoires à travers le monde pendant plusieurs décennies! Leur travail sera facilité par la mise à disposition par les groupes de Nüsslein-Volhard et de Wieschaus de sperme congelé des mâles porteurs, associé à une description détaillée du phénotype mutant. Au terme de l'exploitation du fabuleux matériel ainsi préparé, des progrès considérables auront obligatoirement été faits dans la compréhension du contrôle géné-*

tique du développement des vertébrés... c'est-à-dire notamment des mammifères et de l'homme. Cependant, malgré son extensivité, l'effort conjoint de Nüsslein-Volhard et de Wieschaus n'épuise manifestement pas le champ des mutations de développement. En effet, de par le crible qu'ils ont utilisé, ils n'ont pu isoler les mutants à létalité très précoce, ni ceux à effet maternel qui correspondent pourtant souvent à des gènes jouant le rôle de commutateurs précoces des voies de différenciation, notamment d'établissement des polarités. De plus, le simple examen visuel des embryons ne peut, malgré leur transparence [2], avoir la prétention de tout détecter. Une question supplémentaire qui reste ouverte est de savoir s'il est possible pour un biologiste d'avoir deux fois le prix Nobel pour des travaux différents mais portant l'un et l'autre sur la biologie du développement?

1. Deutsch J, Lamour-Isnard C, Lepesant J. Le prix Nobel 95 attribué à Ed Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard et Eric Wieschaus: la reconnaissance de la génétique du développement. *Med Sci* 1995; 11: 1625-8.
2. Ekker M, Akimenko M. Le poisson zèbre (*Danio rerio*), un modèle en biologie du développement. *Med Sci* 1991; 7: 553-60.
3. Roush W. A new embryo zoo. *Science* 1996; 274: 1608-9.
4. Grunwald DJ. A Fin-de-Siècle achievement: charting new waters in vertebrate biology. *Science* 1996; 274: 1634-5.
5. Holder N. Genes from zebrafish screens. *Nature* 1996; 384: 515-6.

A.K.