

## Clonage de l'ADNc codant pour le récepteur de la thyroïdostimuline (TSH, thyroid-stimulating hormone)

L'équipe de Gilbert Vassart, à Bruxelles, vient de remporter la compétition engagée entre les équipes cherchant à cloner l'ADNc et le gène du récepteur de la TSH. L'approche suivie est fondée sur la PCR et sur la haute probabilité que cette molécule devait appartenir à la famille des récepteurs membranaires couplés à leur système effecteur (ici l'adénylate cyclase) par l'intermédiaire d'une G-protéine. Il s'agit d'utiliser un ensemble d'amorces hybridant avec des régions très conservées des messagers de ce type de récepteur, correspondant aux segments transmembranaires des protéines, d'amplifier par PCR l'ADNc de tissus thyroïdien, de cloner les fragments amplifiés et de déterminer s'ils correspondent à des récepteurs connus. En fait, dans un premier temps, cette stratégie aboutit à la découverte de quatre nouveaux membres de la famille des récepteurs couplés par l'intermédiaire de G-protéines... mais pas à l'isolement de l'ADNc recherché. Parmentier *et al.* supposèrent alors que leur échec était dû à la rareté du messenger spécifique, même dans le tissu thyroïdien, et décidèrent d'amplifier directement des séquences d'ADN génomique [1]. Cette stratégie était raisonnable car la plupart des gènes codant pour les récepteurs de la famille sont dépourvus d'intron. De fait, onze clones possédant des séquences compatibles avec l'appartenance à la famille de récepteurs étudiée furent obtenus, dont un d'un type nouveau. L'insertion de ce clone n'hybridait cependant pas avec les ARN de thyroïde, mais reconnaissait un ARN ovarien de 2,6 kb. Sa séquence est à 70 % similaire à celle d'un ADNc codant

pour le récepteur de la LH-CG (*luteinizing hormone-chorionic gonadotropin*, *m/s* n° 8, vol. 5, p. 609) et pourrait en réalité correspondre à celle de l'ADNc du récepteur de la FSH (*follicle-stimulating hormone*). Quoiqu'il en soit, ce clone fut utilisé pour cribler, à basse stringence, une banque d'ADNc de thyroïde. Un clone sur 50 000 fut isolé, dont l'insertion hybridait à forte stringence avec un ARN thyroïdien de 4,9 kb. La séquence protéique déduite de celle de l'ADNc indique que la molécule codée par ce messenger comporte une portion amino-terminale probablement extracellulaire de 398 acides aminés, suivie par une région de 346 acides aminés comportant sept segments de passage transmembranaire. L'expression de l'ADNc dans les œufs de *Xenopus*, des cellules corticosurrénales ou des cellules COS, aboutit à la synthèse d'un récepteur de la TSH fonctionnel. Ce récepteur est de structure voisine de celui de la LH-CG, surtout au niveau de la région carboxyterminale contenant les segments transmembranaires (70 % de similitudes). Nous saurons très prochainement si ce travail destiné à cloner le gène du récepteur de la TSH... a également mis la main sur celui de la FSH. Dans la foulée de ces clonages, deux équipes, dont celle de Gilbert Vassart, ont utilisé les sondes disponibles pour isoler et exprimer l'ADNc du récepteur humain [2, 3]. Ce dernier est spécifiquement reconnu par des auto-anticorps de malade myxoédémateux qui déplacent l'hormone fixée sur le récepteur.

A. K.

1. Parmentier M, Libert F, Mahenhaut C *et al.* Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* 1989; 246: 1620-2.
2. Libert F, Lefort A, Gérard C *et al.* Cloning, sequencing and expression of the human thyrotropin receptor; evidence for binding of autoantibodies. *Biochim Biophys Res Commun* 1989; 165: 1250-5.
3. Nagoyama Y, Kaulman KD, Seto P, Rapoport B. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochim Biophys Res Commun* 1989; 165: 1184-90.

### ■ ■ ■ BRÈVES ■ ■ ■

**Des mitochondries d'origine paternelle dans le règne végétal.** Les mitochondries chez les animaux sont toujours d'origine maternelle. Les données dont on dispose sont moins nombreuses chez les végétaux. Cependant, si les chloroplastes sont, selon les espèces, d'origine paternelle ou maternelle, il semblait jusqu'à présent que les mitochondries obéissaient à la règle générale. Une exception vient d'être signalée, et non des moindres, puisqu'il s'agit du séquoia côtier, *Sequoia sempervirens*, qui fait partie des conifères. Un croisement a été pratiqué entre plusieurs individus, et grâce à des fragments de restriction une équipe californienne [1] a pu montrer que l'ADN des mitochondries, comme celui des chloroplastes d'ailleurs, provenait du donneur paternel. C'est probablement le premier exemple de mitochondries qu'on ait trouvé d'origine uniquement paternelle.

[1. Neale DB, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4347-9.]

■ ■ ■ **La biologie de la mémorisation** est un domaine des plus difficiles à explorer. La plupart des observations ont été réalisées chez des invertébrés, et, quel que soit l'importance du phénomène, on a quelque difficulté à considérer que le qualificatif de « mémoire » attribué à un neurone de ganglion d'aplysie puisse correspondre à la fonction supérieure dont sont, globalement, pourvus les mammifères. On accueille donc toujours avec beaucoup d'intérêt la mise en évidence de la moindre corrélation entre des étapes connues de la mémorisation et des modifications de la biologie cellulaire chez des mammifères. Olds *et al.* [1] viennent de décrire l'une de ces corrélations. Le modèle utilisé est le très classique réflexe de la membrane nictitante chez le lapin. On conditionne des lapins en associant un son à un choc électrique périorbitaire déclenchant un réflexe de rétraction de la membrane nictitante. On compare les résultats à ceux obtenus dans deux groupes témoins, des lapins totalement naïfs et des lapins recevant le choc de façon aléatoire par rapport au son. Lorsqu'on arrête le traitement conditionnant, au bout de trois jours, on observe — comme prévu — une association du réflexe et du son, en l'absence du choc électrique, chez les lapins conditionnés et pas chez ceux des deux groupes-contrôle. Les auteurs sont allés observer les modifications dans la concentration et la localisation d'une enzyme, la protéine kinase C (PKC), au niveau des neurones pyramidaux de l'hippocampe, une région du cortex cérébral connue pour participer aux phénomènes de mémorisation [2]. L'activité de la PKC, étudiée par autoradiographie, est effectivement modifiée chez les lapins conditionnés (et uniquement chez ceux-là) un et trois jours après arrêt du traitement conditionnant, c'est-à-dire en rapport avec le phénomène de mémoire. L'enzyme, dont l'activité augmente, est tout d'abord déplacée du cytosol vers la membrane du corps cellulaire à un jour. Elle est

ensuite, à trois jours, retrouvée essentiellement au niveau non plus du corps mais des dendrites des neurones pyramidaux de l'hippocampe. A quoi correspondent ces modifications ? Du point de vue cellulaire, on peut éventuellement faire des hypothèses. On peut en particulier suggérer que la production de la PKC (au niveau du corps cellulaire) et son déplacement vers les dendrites correspondent à un phénomène de consolidation à long terme de contacts synaptiques, base hypothétique de la mémorisation. Mais du point de vue du comportement général de l'animal, l'énigme reste toujours aussi entière, car l'on ne voit pas bien quelle hypothèse proposer pour lier un phénomène synaptique ponctuel dans l'hippocampe et un mécanisme apparemment aussi complexe qu'un « réflexe conditionné ».

[1. Olds JL, *et al. Science* 1989 ; 245 : 866-9.]

[2. Press GA, *et al. Nature* 1989 ; 341 : 54-7.]

■ ■ ■ **Le facteur de croissance des hépatocytes.** L'hépatectomie partielle provoque, en réponse, une hyperprolifération compensatrice due à la libération de facteurs de croissance dont le plus actif est HGF (*hepatocyte growth factor*). Une équipe japonaise de Kyushu [1], associée à une firme pharmaceutique, vient de cloner l'ADNc codant pour cette molécule. Elle est synthétisée par différents tissus, dont les hépatocytes et des cellules sanguines, sous la forme d'un précurseur de 728 acides aminés formé d'un peptide signal de 29 résidus, d'une proséquence de 25 résidus, d'une chaîne  $\alpha$  de 440 résidus et d'une chaîne  $\beta$  de 234 résidus à l'extrémité carboxyterminale. La molécule active est formée, après élimination des pré- et proséquences et clivage entre la région  $\alpha$  et la région  $\beta$ , des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  reliées par un pont disulfure. La séquence protéique est à 38 % similaire à celle du plasminogène. La protéine est d'une très grande activité. Elle pourrait avoir d'importantes indications pour favoriser la

régénération hépatique, par exemple après hépatectomie partielle pour rupture traumatique du foie ou tumeur. Dans les hépatites aiguës, la concentration plasmatique d'HGF est déjà très élevée, probablement du fait de la cytolyse. Il peut donc paraître improbable qu'HGF soit indiqué dans ces cas.

[1. Nakamura T, *et al. Nature* 1989 ; 342 : 440-3.]

■ ■ ■ **L'insularité peut provoquer l'apparition d'animaux nains.** On connaît plusieurs exemples de nanisme survenu chez des animaux au début de l'ère quaternaire sur des îles, notamment chez des éléphants, des hippopotames ou des cerfs. Pour la première fois, la chronologie d'un tel phénomène a pu être établie par un chercheur britannique [1]. On a trouvé dans la grotte de Belle-Hougue, au nord de l'île de Jersey, des ossements et des bois provenant d'une forme naine de cerf (*Cervus elaphus*) ; à la Cotte, sur la côte sud, des spécimens proviennent au contraire de cerfs de taille normale. Une datation utilisant plusieurs méthodes fait remonter les cerfs nains, dont le poids était d'environ 1/6 de celui des cervidés habituels (autour de 35 kg), à la dernière période interglaciaire, qui n'aurait duré que 11 000 ans, de 126 000 à 115 000. Sur des arguments géologiques et climatiques (séparation de Jersey du continent, montée des eaux), l'auteur conclut que la réduction de taille s'est effectuée au maximum en 6 000 ans, temps géologique extrêmement court, alors que le cerf commun européen existait depuis 400 000 ans sans changements appréciables. Quant aux causes favorisant l'apparition et la survie d'animaux nains, on ne peut que faire des hypothèses, invoquant une sélection par limitation des ressources et absence de prédateurs. La population naine ne semble pas avoir survécu au rétablissement d'un lien terrestre avec le continent à la fin de cette période.

[1. Lister AM. *Nature* 1989 ; 342 : 539-42.]

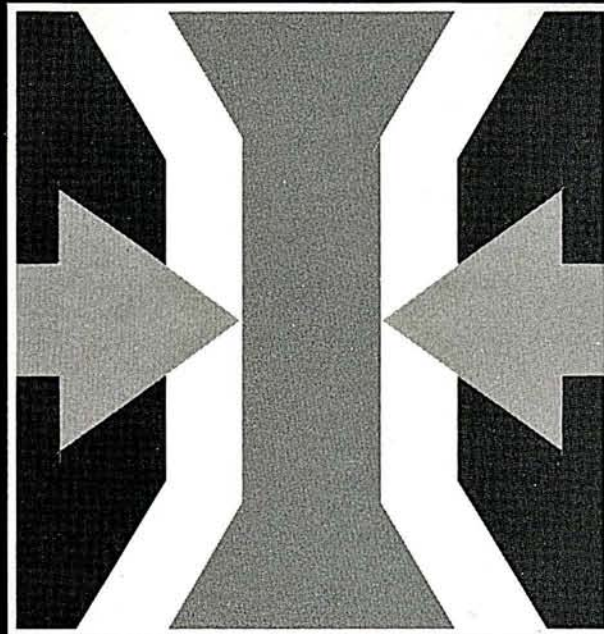
# O.E.S.O.

Organisation internationale d'Etudes Statistiques pour les maladies de l'Oesophage  
PRESIDENT D'HONNEUR : J.L. LORTAT-JACOB - COORDINATION : R. GIULI

## 3<sup>EME</sup> CONGRES INTERNATIONAL POLYDISCIPLINAIRE

### 19 / 23 JUIN 1990 - PARIS

PRESIDENTS du CONGRES : R. LAMBERT (Lyon) et D.B. SKINNER (New-York) - PRESIDENT d'HONNEUR du CONGRES : R. BELSEY



## LES TROUBLES MOTEURS PRIMITIFS DE L'ŒSOPHAGE

### 370 REPONSES A 370 QUESTIONS

DES DISCUSSIONS DIRECTES AVEC LES GRANDS SPECIALISTES DU MONDE,  
GASTRO-ENTEROLOGUES, ENDOSCOPISTES, PHYSIOLOGISTES, PEDIATRES, ANATOMO-PATHOLOGISTES  
ET CHIRURGIENS.

- 19 JUIN : Manométrie chez le sujet normal.  
Physiologie de l'oesophage.  
Caractères généraux des maladies motrices.
- 20 JUIN : Achalasie du SIO.
- 21 JUIN : Achalasie du SSO.  
Spasmes diffus de l'oesophage.
- 22 JUIN : Oesophage casse-noisettes. Diverticules.
- 23 JUIN : Douleurs pseudo-angineuses. RGO et motricité.

et chaque jour, des **SESSIONS PARALLELES**

orales et vidéo,  
portant sur **TOUS** les **SUJETS**  
de la pathologie œsophagienne.

- DES DEJEUNERS-DEBATS  
au cours desquels seront organisés des échanges quotidiens  
avec les spécialistes internationaux sur des thèmes précis  
concernant les investigations et les traitements actuels de  
l'œsophagite et des maladies motrices de l'oesophage.

**RESUMES ACCEPTES  
JUSQU'AU 1er AVRIL 1990**

RENSEIGNEMENTS : MICHELE LIEGEON O.E.S.O. 2, BD. DU MONTPARNASSE - 75015 PARIS - TEL. (1) 45.66.91.15 - FAX (1) 45.66.50.72

## ■ ■ ■ BRÈVES ■ ■ ■

uniques, ils doivent tout d'abord se fragmenter en vésicules. Dans l'interphase, le transit des protéines entre le réticulum endoplasmique, le corps de Golgi et la membrane plasmique se fait normalement par bourgeonnement et fusion de vésicules de transport. Pendant la division cellulaire, le bourgeonnement continue, mais la fusion des vésicules est inhibée, ce qui aboutit à la suppression du transit protéique et à la fragmentation du Golgi ainsi que, le plus souvent, du réticulum endoplasmique. Une équipe de l'EMBL (Heidelberg, RFA) et de Montpellier (France) vient de suggérer que l'inhibition de la fusion des vésicules pourrait être une conséquence directe de l'action de la kinase p34<sup>cdc2</sup>. En effet, des vésicules endocytiques de cellules rénales de hamster fusionnent en présence d'un extrait interphasique d'ovocytes de *Xenopus*, mais pas d'un extrait de cellules en mitose. L'addition à un extrait interphasique de la protéine p34<sup>cdc2</sup> d'étoile de mer reproduit l'inhibition de la fusion [1, 2]. Le système p34<sup>cdc2</sup>/MPF pourrait ainsi bien tenir sous son contrôle les différentes étapes, nucléaires et cytoplasmiques, de la division cellulaire.

[1. Tuomikoski T, *et al. Nature* 1989 ; 342 : 942-5.]

[2. Warren G. *Nature* 1989 ; 342 : 857-8.]

■ ■ ■ **L'atrophie de la rétine due au déficit en ornithine aminotransférase.** L'atrophie circulaire de la rétine (*gyrate atrophy*) est une maladie à hérédité récessive autosomique qui entraîne une perte progressive de la vision allant jusqu'à la cécité complète, par dégénérescence chorio-rétinienne. Elle est liée à un déficit de l'enzyme ornithine aminotransférase, enzyme localisée dans la matrice mitochondriale. Bien que le déficit affecte de nombreux tissus, c'est le système visuel qui est électivement frappé. L'enzyme possède comme cofacteur le phosphate de pyridoxal ; certaines formes du déficit répondent

au traitement par la vitamine B6 et d'autres non. L'enzyme intervient dans le catabolisme de l'ornithine, qu'elle transforme en glutamate et proline, et l'hyperornithinémie est le principal signe humoral de la maladie. L'enzyme est synthétisée dans le cytoplasme sous forme d'un précurseur de 48 kDa ; après ablation d'une séquence signal, la sous-unité mature de 45 kDa forme des oligomères de quatre ou six sous-unités. Le clonage de l'ADN complémentaire a permis de localiser le gène sur le chromosome 10, avec des séquences voisines sur l'X. Des sondes obtenues à partir de l'ADNc ont été utilisées pour étudier plusieurs cas et ont montré la diversité des lésions moléculaires. Sur les cinq malades examinés en détail par les trois groupes [1-3], on trouve dans tous les cas une mutation ponctuelle, dont les conséquences sont : trois fois un changement d'un seul acide aminé ; une fois, une mutation du codon initiateur empêchant la production de la protéine, et premier exemple d'une mutation de ce type en dehors des thalassémies ; et une fois, une délétion partielle du message par disparition d'un site d'épissage. On peut par ailleurs constater que deux des sujets au moins sont des hétérozygotes composés : chez eux, le produit d'expression d'un seul des deux allèles a pu être analysé, l'autre n'étant pas exprimé, peut-être à cause d'une altération du promoteur. Enfin, la grande hétérogénéité des anomalies de l'ornithine aminotransférase est confirmée par une liste supplémentaire de mutants fournie par l'équipe de Montréal [4], qui a également entrepris l'étude génétique des principaux d'entre eux.

[1. Ramesh V, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 3777-80.]

[2. Mitchell GA, *et al. J Clin Invest* 1988 ; 81 : 630-3.]

[3. Inana G, *et al. J Biol Chem* 1989 ; 264 : 17432-6.]

[4. Mitchell GA, *et al. médecine/sciences* 1989 ; 3 (suppl) : 28A (abstr).]

■ ■ ■ **Endothéline, rein et ciclosporine.** L'analyse des effets rénaux de l'endothéline (EN) suscite encore beaucoup d'études car la circulation rénale semble électivement sensible à cette substance. C'est ce qu'ont démontré Hirata chez les rats spontanément hypertendus de souche japonaise (SHR), et dans leur souche témoin normotendue WKH. Dans les deux souches, EN augmente la pression artérielle et diminue le débit cardiaque, le débit sanguin rénal et le débit de filtration glomérulaire. Les effets sur la natriurèse dépendent de la dose. Les effets de l'EN sont presque totalement abolis par l'administration de peptide natriurétique atrial, mais les deux substances ont été utilisées à des doses très fortes. L'EN enfin semble exercer son action vasoconstrictive rénale sur les artères arquées et interlobulaires, ainsi que les artéioles préglomérulaires [1]. La ciclosporine (CiA) induit également une vasoconstriction rénale qui pourrait dépendre de la libération d'EN par les cellules endothéliales. C'est pourquoi plusieurs études expérimentales ont été faites sur le rein perfusé isolé de rat et chez le rat *in vivo* pour tester les effets de la CiA et d'anticorps anti-EN porcine obtenus chez le lapin. Dadan *et al.* [2] et Kon *et al.* [3] ont montré que ces anticorps atténuent remarquablement la vasoconstriction rénale produite par la CiA (alors que des anticorps non spécifiques n'avaient pas d'effet).

[1. Hirata Y, *et al. Circ Res* 1989 ; 65 : 1370-9.]

[2. Dadan J, *et al. Kidney Int* 1990 (sous presse).]

[3. Kon V, *et al. Kidney Int* 1990 (sous presse).]

■ ■ ■ **Détection prénatale du sexe de l'embryon à partir d'un échantillon de sang maternel.** Au cours de la grossesse, un petit nombre de cellules de l'embryon passe dans la circulation maternelle. De ce fait, la femme enceinte d'un embryon mâle possède dans son sang quelques cellules mâles

de formule chromosomique XY. Il est ainsi possible, en utilisant des amorces spécifiques du chromosome Y, de procéder par PCR à une amplification spécifique d'un fragment de l'ADN de chromosome Y présent dans l'ADN extrait des cellules sanguines de la femme. Si le test est négatif, cela signifie que l'embryon est femelle, possédant deux chromosomes X par cellule. Pour sensibiliser la détection, les chercheurs anglais (Oxford) et italiens (Milan) qui ont rapporté ces résultats [1] ont procédé à deux programmes d'amplification successifs, le second utilisant des amorces situées à l'intérieur du fragment amplifié lors du premier programme. L'envers de la médaille de l'utilisation de telles amorces « emboîtées » est qu'une telle procédure accroît considérablement les risques de contamination des échantillons testés, surtout avec des traces d'un fragment antérieurement amplifié des millions de fois. Pour éviter, autant que faire se peut, de telles contaminations, les auteurs conseillent d'éviter toute amplification d'ADN de tissus mâles dans le laboratoire où se déroulent les tests ; de plus, les différentes manipulations sont effectuées exclusivement par les femmes, peu susceptibles de contaminer les échantillons avec de l'ADN mâle. Malgré toutes ces précautions, il est prévisible que le test restera délicat... peut-être heureusement, car cela évitera de le banaliser, ce qui pourrait aboutir à une forte augmentation des demandes d'interruption de grossesse uniquement fondées sur l'envie d'avoir un enfant d'un sexe déterminé.

[1. Lo YM D, *et al. Lancet* 1989 ; II : 1363-6.]

■ ■ ■ **Des Japonais prémunis contre l'athérome ?** On sait qu'un taux élevé de lipoprotéines HDL est considéré comme un facteur favorable dans la prévention de l'athérome. On connaît certaines familles à HDL élevées, mais la base moléculaire de cette caractéristique restait inconnue.

Elle vient d'être élucidée dans une famille japonaise par une équipe internationale (douze auteurs). Chez un frère et une sœur, la protéine de transfert plasmatique des esters du cholestérol, une protéine de 74 kDa, s'est montrée totalement absente par des méthodes immunologiques. L'emploi d'un ADN complémentaire, joint aux techniques d'amplification de l'ADN, a montré chez les deux sujets une mutation ponctuelle G → A siégeant au site donneur de l'intron 14 (le gène contient 16 exons), empêchant l'épissage normal du messenger et expliquant l'absence totale de protéine. Cette mutation pourrait être consécutive, comme il est fréquent, à la désamination d'une cytosine sur le brin non codant. L'élévation considérable (quatre à six fois la normale) des HDL chez ces sujets est probablement la conséquence d'un ralentissement de leur catabolisme et plaide en faveur de l'importance de la protéine de transport dans ce catabolisme. Les deux homozygotes, qui ont également un taux faible de LDL, ne présentent aucun trouble clinique apparent. Les auteurs font remarquer que cette protéine est absente dans des espèces (rat, chien, porc) relativement résistantes à l'athérome, et soulèvent la question de l'utilisation des inhibiteurs de la protéine de transport comme agents anti-athérogènes. [Brown ML, *et al. Nature* 1989 ; 342 : 448-51.]

■ ■ ■ **Un rôle périphérique pour la protéine kinase p34<sup>cdc2</sup>, élément actif du MPF (mitosis ou maturation promoting factor).** Le MPF est constitué du produit du gène *cdc2* (p34<sup>cdc2</sup>) et de la cycline (voir articles de M. Dorée et de C. Le Peuch, *m/s* n° 1, vol. 6, p. 8 et 10). La kinase p34<sup>cdc2</sup> joue un rôle essentiel dans le déclenchement de la mitose cellulaire. Au cours de la division cellulaire, les organites se répartissent au hasard dans les deux cellules filles lorsqu'ils sont multiples (mitochondries, péroxysomes, etc.) ; lorsqu'ils sont