

■■■■ **Le transcriptome des interférons : une utilisation des *microarrays*.** Que la technique est jolie [1, 2] ! On a lu jusqu'à présent plus de revues sur la technique des puces à ADN que sur ses résultats, mais ceux-ci commencent d'arriver. Des chercheurs de Cleveland (OH, USA) ont utilisé des *microarrays* d'oligonucléotides sondes correspondant aux produits PCR de 6800 gènes pour mettre à jour ceux dont la régulation transcriptionnelle dépend des interférons  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  [3]. Après incubation de 6 heures en présence de 1000 unités internationales de chacun des interférons, ils ont étudié les profils d'ARNm d'une lignée cellulaire humaine de fibrosarcome, HT1080. Parmi ces ARNm, on savait déjà que la synthèse de certains dépendait des interférons : leur profil d'expression n'a apporté aucune surprise. En revanche, on a trouvé de très nombreux gènes dont la régulation transcriptionnelle par les interférons était inconnue et dont la fonction est étonnamment diverse. On recherchait des gènes impliqués dans l'apoptose qui est une réponse à l'agression virale : le gène de la scramblase des phospholipides, qui permet le passage de la phosphatidylsérine du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique et participe ainsi à la reconnaissance par les phagocytes, est un des gènes les plus inductibles par les interférons. On a aussi trouvé une stimulation (modeste) de gènes anti-apoptotiques comme *BCL2*, donnant un éclairage sur l'équilibre apoptose/anti-apoptose. Certains gènes sont sélectivement contrôlés par l'un des interférons, ce qui a de l'importance pour leur utilisation thérapeutique. Par exemple, l'expression du gène *HIF1A* est stimulée par l'interféron  $\beta$ . Le facteur HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor*) est impliqué dans la réponse à l'hypoxie de deux manières : en stimulant la synthèse de l'érythropoïétine et du VEGF, mais aussi en induisant l'apoptose par l'expression de p53 et de p21

[4]. On ne peut donner que quelques exemples, mais l'ensemble des résultats est accessible sur le site Internet des auteurs [5]. N'oublions cependant pas que « seuls » 6800 gènes ont été criblés, ce qui est peu au regard de la totalité des gènes humains : on ne cherche que dans ce que l'on connaît. L'histoire de la régulation des gènes ne fait que commencer.

- [1. Bellis M, Casellas P. *Med Sci* 1997; 13: 1317-24.]
- [2. Jordan B. *Med Sci* 1998; 14: 1097-102.]
- [3. Der SD, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15623-8.]
- [4. Carmeliet P, et al. *Nature* 1998; 394: 485-90.]
- [5. [www.lri.ccf.org/ri/pi/williams.html](http://www.lri.ccf.org/ri/pi/williams.html).]

■■■■ **La dystroglycane : une protéine essentielle dans l'organisation des membranes basales.** Connaître ses propres limites, voilà une gageure à laquelle l'équipe de K. Campbell (Iowa, USA) s'est attaquée. Nous avons déjà rapporté dans ces colonnes les résultats de l'invalidation du gène de la dystroglycane obtenus par cette équipe. La létalité très précoce observée est provoquée par le défaut d'organisation de la membrane de Reichert, frontière entre le sac vitellin et le sang maternel (*m/s* 1997, n° 10, p. 1187). Il semble que ce rôle fédérateur de la dystroglycane dans l'agencement d'une membrane basale ne se limite pas à cette première structure membranaire formée dans l'embryon de rongeur mais s'étende à l'organisation des membranes basales en général, notamment par ses interactions privilégiées avec les domaines G des laminines. Les laminines forment, avec le collagène de type IV et les protéines entacine/nidogène et perlecan, un lacis essentiel pour la composition des membranes basales. Cependant, ces interactions ne suffisaient pas, jusqu'à présent, à expli-

quer leur formation *in vivo*. La constitution de ces membranes, parfois éloignée du lieu de synthèse des protéines constitutives, laissait suggérer l'existence de récepteurs cellulaires capables d'assurer un rôle « d'organisateur de membrane ». En utilisant les cellules ES portant l'événement d'invalidation du gène de la dystroglycane et la technique des corps embryoides (la culture de cellules ES en gouttes permet la formation d'un amas cellulaire, le corps embryoides, qui peut se différencier), l'équipe de Campbell vient de révéler que la dystroglycane serait susceptible de jouer un tel rôle [1]. En effet, si ces cellules ES sont capables de former des corps embryoides contenant un endoderme différencié et des cardiomyocytes fonctionnels [2] (les deux types cellulaires exprimant la dystroglycane dans ces structures), en revanche, la localisation de la laminine 1, du collagène de type IV ou du perlecan est altérée au niveau de la membrane basale subendodermique de ces corps embryoides. L'analyse ultrastructurale de cette région révèle une morphologie normalement polarisée des cellules endodermiques mais l'absence de formation de la membrane basale. Enfin, la dystroglycane est nécessaire pour l'organisation de la laminine soluble à la surface des cellules ES, suggérant que le complexe dystroglycane-laminine constitue une étape précoce indispensable dans la formation d'une membrane basale. Par la suite, d'autres molécules spécifiques de cette basale viennent parachever sa mise en place. Il sera intéressant de savoir si ce rôle essentiel d'organisateur de membrane basale au cours du développement embryonnaire précoce est également applicable à des tissus adultes différenciés comme le muscle squelettique ou la jonction neuromusculaire.

- [1. Henry MD, Campbell K. *Cell* 1998; 95: 859-70.]
- [2. Loubet M, Fiszman M. *Med Sci* 1998; 14: 1072-6.]

■■■■ **Polydactylie moléculaire à façon, ou comment fabriquer une protéine régulatrice pour chaque promoteur.** Parmi les domaines de liaison à l'ADN des facteurs transcriptionnels, les modules appelés doigt de zinc, incluant un atome de Zn chélaté par quatre acides aminés, ont été particulièrement étudiés. On distingue les modules comprenant 4 Cys, comme dans les récepteurs nucléaires, et ceux comprenant 2 Cys et 2 His. Ce dernier module relativement simple comprend, entre autres, une hélice  $\alpha$  qui peut entrer en contact avec les bases de l'ADN dans le grand sillon. Plusieurs équipes ont acquis une connaissance structurale approfondie du mécanisme d'interaction entre ce module et l'ADN. A partir de ces connaissances, il a été possible de concevoir des modules reconnaissant des séquences d'ADN distinctes. Ces séquences sont constituées de 3 bases consécutives, GNN, avec un G en 5', les deux autres bases étant relativement spécifiques de chaque module. Ainsi, l'équipe de C. Barbas au Scripps Institute, disposait d'une banque de 64 modules reconnaissant chacun une séquence spécifique [1]. Or on savait qu'en couplant n modules, on pouvait fabriquer une protéine reconnaissant avec une bonne affinité une séquence de taille 3n. Les auteurs ont sélectionné une séquence riche en G de 18 bases dans le promoteur du gène *erbB-2/HER-2*, et une protéine polydactyle à 6 doigts de Zn reconnaissant spécifiquement cette séquence a été synthétisée. Le caractère fonctionnel de cette protéine a été évalué dans des expériences de transfection cellulaire. Lorsque cette protéine est couplée à un domaine activateur de la transcription, elle se comporte comme un transactivateur spécifique du promoteur. En revanche, lorsque cette protéine est couplée à un domaine répresseur de la transcription, elle se comporte alors comme un répresseur spécifique de ce promoteur. Rappelons que d'autres techniques ont été pro-

posées dans ce même but par l'équipe de Carl Pabo [2]. Ces résultats suggèrent qu'il est possible de concevoir pour chaque promoteur une protéine activatrice ou inhibitrice, la seule condition étant de cibler une séquence relativement riche en G. Les applications de cette approche peuvent être nombreuses en transgénèse et en thérapie génique ; une des plus prometteuses serait, en utilisant des protéines polydactyles couplées à un domaine répresseur, d'effectuer l'invalidation fonctionnelle d'un gène de manière plus rapide que par les techniques classiques.

- [1. Beerli RR, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 14628-33.]  
 [2. Greisman HA, *et al. Science* 1997 ; 275 : 657-61.]

■■■■ **Un couplage entre synthèse et repliement des protéines.** Au même titre que le cycle cellulaire ou l'apoptose, l'adaptation à des situations de danger, par exemple une carence nutritive ou une attaque virale, communément appelées *stress*, est un des processus essentiels et extrêmement conservé au cours de l'évolution de toutes les cellules vivantes. Une protéine régulatrice centrale de la réponse au *stress* est le facteur d'initiation de la traduction protéique eIF2 $\alpha$ . Sa phosphorylation interrompt son activité et la synthèse protéique s'arrête. Il existe, en outre, un couplage entre le repliement des protéines au niveau du réticulum endoplasmique et la traduction : l'accumulation dans le réticulum endoplasmique de protéines non ou mal repliées bloque la synthèse. Chez la levure, deux protéines sont impliquées dans cet effet : GCN2 et Ire1. La protéine GCN2 est une kinase responsable de la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ , activée par la privation en acides aminés ; la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  entraîne l'arrêt de la synthèse de certaines phases de lecture de l'ARN du gène *GCN4* situées en amont de la phase codant pour la protéine GCN4 elle-même,

et cela au profit d'une expression accrue de GCN4. Cette protéine, à son tour, stimule la transcription des messagers codant pour les enzymes de synthèse des acides aminés manquant dans le milieu. La seconde protéine, Ire1, est à la fois une kinase et une ribonucléase. Elle est stimulée (oligomérisation et autophosphorylation) lorsque le taux de protéines non repliées augmente dans le réticulum endoplasmique. La partie enzymatique est alors activée et excise un intron du préARNm *HAC1* permettant à celui-ci de mûrir et de coder pour plusieurs protéines chaperons. Deux kinases de eIF2 $\alpha$  étaient déjà connues dans les cellules de mammifères, PKR (protéine kinase dépendante des ARN), et HRI (*heme-regulated inhibitor*). Deux groupes viennent maintenant de découvrir une nouvelle kinase de cette famille possédant les propriétés de Ire1 de reconnaître les protéines mal repliées s'accumulant dans le réticulum endoplasmique, et celle de GCN2 de phosphoryler eIF2 $\alpha$ , bloquant alors la synthèse protéique. Cette molécule, appelée PEK dans un cas pour *pancreatic eIF2 $\alpha$  kinase* [1] ou PERK pour *PKR-like ER kinase* [2] présente un domaine intraluminal dans le réticulum endoplasmique homologue d'Ire1 et sensible aux défauts de repliement des protéines, tandis que le domaine cytoplasmique portant l'activité kinase est proche de ceux de la PKR et de GNC2. Activée en réponse à une accumulation de protéines dans la lumière du réticulum endoplasmique, PEK/PERK phosphoryle eIF2 $\alpha$  sur la sérine 51 et bloque la synthèse protéique. La fonction ribonucléase semble, en revanche, avoir disparu de la nouvelle molécule. Un exemple original de conservation de fonction et de domaines fonctionnels ancestraux, associée à un remodelage moléculaire spectaculaire.

- [1. Shi Y, *et al. Mol Cell Biol* 1998 ; 18 : 7499-509.]  
 [2. Harding HP, *et al. Nature* 1999 ; 397 : 271-4.]

■■■■ **En aval des cytokines, SSI-1 et Bax...**

La régulation homéostasique des populations cellulaires est un équilibre entre prolifération, arrêt de la croissance et apoptose régi principalement par les cytokines et les facteurs de croissance. *médecine/sciences* a rapporté largement la voie des JAK, tyrosine-kinases de transmission du signal, et des STAT (*signal transducers and activators of transcription*) qui conduit le signal du récepteur de cytokines activé à la régulation transcriptionnelle dans le noyau [1]. Les connaissances sur la régulation du contrôle négatif sont plus récentes. Une famille de protéines a été décrite qui inhibent la transmission du signal des cytokines en interagissant par leurs domaines SH2 avec les JAK, inhibant leur activité de tyrosine kinase. Cette famille, dont la synthèse est stimulée par STAT, a été nommée SSI (*STAT-induced STAT inhibitors*) (*m/s* 1997, n° 10, p. 1196). Aujourd'hui ce contrôle négatif est analysé plus finement

après la création de souris transgéniques au gène codant pour SSI-1 invalidé par recombinaison homologue [2]. Les souris *SSI-1<sup>-/-</sup>* semblent normales à la naissance mais perdent rapidement du poids (- 40 % à 9 jours) et meurent au cours des trois premières semaines. La majorité des études ont donc été faites sur les souris de 10 jours. Une anomalie du rétrocontrôle négatif de SSI-1 sur le signal cytokine a été retrouvée *in vitro*: les thymocytes *SSI-1<sup>-/-</sup>* stimulés par l'interleukine-2 (IL-2) ou l'IL-4 induisent une prolifération lymphocytaire supérieure à celle des témoins. Dans le thymus et la rate, de nombreux lymphocytes montrent toutefois des signes d'apoptose par la méthode TUNNEL et chez les souris de 10 jours il ne reste que 20 % à 25 % des lymphocytes. Il faut noter que les cellules restantes sont normalement différenciées. L'analyse des diverses molécules pro- et anti-apoptotiques a montré une surexpression isolée de Bax; les expressions de

Bcl2, de Fas et de son ligand, de TNF et des glucocorticoïdes sont identiques à celles des souris témoin. Le phénotype des souris *SSI-1<sup>-/-</sup>* rappelle tout à fait celui des souris *BCL2<sup>-/-</sup>*: normales à la naissance, ces dernières ont un retard de croissance, une réduction de leur durée de vie et une apoptose massive dans la rate et le thymus [3]. Cette similitude de phénotypes renforce l'hypothèse d'un rôle de l'équilibre entre Bax et Bcl2 dans la réponse aux stimulus apoptotiques [4]. Ce qui stimule l'expression de Bax chez les souris *SSI-1<sup>-/-</sup>* n'est pas clair: SSI-1 inhibe-t-il une autre voie de transmission du signal qui stimule l'expression de Bax?

[1. Vignais M. *Med Sci* 1997; 13: 1277-84.]

[2. Naka T, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15577-82.]

[3. Veis DJ, *et al. Cell* 1993; 75: 229-40.]

[4. Martinou J. *Med Sci* 1995; 11: 367-73.]



Enseignement organisé dans le cadre de la Faculté de Médecine Paris-Sud, et de l'Université Paris XI.

• **Début** : 3 novembre 1999

• **Enseignement de 2 ans à temps plein**, destiné aux jeunes oncologues diplômés, titulaires par ailleurs d'un DEA ou équivalent, et désireux de recevoir un enseignement de haut niveau en recherche clinique en cancérologie. Ouvert aux spécialistes, Docteurs en médecine, Oncologues médicaux et pédiatres, Chirurgiens, Radiothérapeutes, Radiologistes, Pathologistes, Biologistes, Statisticiens, etc., et aux Docteurs en Pharmacie.

• **De toutes nationalités**, mais une très bonne connaissance du français et de l'anglais est indispensable. Cours en Français, certains exposés et mémoires pourront être présentés en Anglais.

• **Une formation approfondie** dans le domaine de la recherche clinique en cancérologie est offerte, comportant un enseignement théorique, et des stages cliniques ou de laboratoire.

> **Fonctions effectives avec responsabilités pendant 2 ans à plein temps**, dans sa spécialité d'origine, et 6 mois au minimum dans une autre, à l'institut Gustave-ROUSSY. Option : 1 année sur les 2 consacrée à un travail personnel dans un laboratoire de recherche de l'IGR.

> **Enseignement théorique, obligatoire et commun à tous, de 340 heures en 2 ans. Il comporte : 8 modules de 5 jours** (cours, discussions de dossiers, de documents ou de techniques, avec forte participation des élèves), les uns généraux, les autres spécialisés : 1 enseignement de statistiques, épidémiologie et santé publique réparti sur les 2 ans ; 1 séminaire de 2 à 3 h tous les 15 jours sur un sujet limité.

> **Travail personnel de recherche clinique ou biologique** aboutissant en 2 ans à la rédaction et la soutenance de 1 ou 2 mémoires.

> **Formation individualisée**, reposant sur un encadrement très proche : tuteur, directeur de stage et de mémoire.

• **L'attribution du Diplôme** fait suite à une évaluation finale portant sur les notes des examens suivant chaque module, l'évaluation des mémoires, l'avis du « tuteur » de chaque étudiant et celui des responsables de ses stages.

• **Les promotions sont limitées à 15 élèves chaque année.**

• **Les candidats pourront éventuellement bénéficier d'une bourse ou d'un salaire** de 2000 Euros par mois pour leur première année (# 2350 \$ US). Ils sont invités à se procurer une bourse pour la 2<sup>e</sup> année.

**Renseignements et dossier de candidature** à demander à Mme Anne-Marie RIVIÈRE par courrier ou E-mail : arivière@igr.fr.

**Candidatures par écrit avant le 1<sup>er</sup> avril 1999**, adressées au Professeur Jean LEMERLE, Directeur du D.U.E.R.C.C. (E-mail : lemerle@igr.fr.) ou au Professeur Martin SCHLUMBERGER, Directeur des Études

(E-mail : schlumbg@igr.fr) - INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY, 94805 VILLEJUIF (France)