

de la sélectine P, sont dépourvues de l'ARN messager correspondant à cette protéine. En revanche, l'ARN messager codant pour la sélectine E est aussi abondant que chez les souris normales. Les plaquettes activées des souris transgéniques sont totalement dépourvues de sélectine P, mais expriment le facteur de von Willebrand. Les cellules endothéliales du poumon des souris transgéniques n'expriment pas la sélectine P, mais expriment elles aussi le facteur de von Willebrand. Les lymphocytes des souris transgéniques expriment la sélectine L au même niveau que ceux des souris normales. L'inactivation* du gène de la sélectine P ne touche donc aucun des autres gènes étudiés, et en particulier ne modifie pas l'expression des sélectines E et L dont les gènes sont voisins de celui de la sélectine P.

Les souris transgéniques ont un nombre de plaquettes normal (980 000/ μ l), un nombre de leucocytes également normal (2 800/ μ l), mais cependant un nombre de polynucléaires neutrophiles (200/ μ l) deux à quatre fois plus élevé que celui des souris normales.

L'observation des veinules du mésentère au microscope montre que, dans le cas des souris normales, le nombre de leucocytes roulant sur le tapis de cellules endothéliales est d'environ 10/min avant stimulation, et environ 25/min après stimulation par un ionophore du calcium; en revanche, dans le cas des souris transgéniques, la fréquence de leucocytes roulants est nulle ou presque. Le nombre de polynucléaires neutrophiles, attirés dans le péritoine par administration de thioglycolate, reste insignifiant pendant les deux premières heures suivant l'injection du stimulant dans le cas des souris transgéniques, alors que dans le cas des souris normales, quelque 3 000 000 de polynucléaires neutrophiles sont attirés dans ce délai. Après quatre heures, le nombre de polynucléaires neutro-

philes est environ deux fois plus faible chez les souris mutées que chez les souris normales.

Les souris déficientes en sélectine P ont donc une durée de vie comparable à celle des souris normales, restent en bonne santé pour au moins 12 mois, ont un nombre de neutrophiles circulants élevés, et présentent un recrutement retardé des polynucléaires neutrophiles au point d'inflammation. En conclusion, grâce aux souris transgéniques obtenues par inactivation* sélective du gène de la sélectine P, on peut dire qu'il est maintenant clairement démontré que la sélectine P joue un rôle clé dans la circulation des neutrophiles, dans l'étape précise de l'extravasation (le roulement des neutrophiles sur le tapis des cellules endothéliales activées des vaisseaux sanguins) et le recrutement des polynucléaires neutrophiles au point d'inflammation.

M. M.

1. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-34.
2. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993; 91: 379-87.
3. Johnston GI, Cook RG, McEver RP. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* 1989; 56: 1033-44.
4. Lasky LA. Selectins: interpreters of cell specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 1992; 258: 964-9.
5. Atherton A, Born GVR. Quantitative investigation of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls. *J Physiol* 1972; 222: 447-74.
6. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin deficient mice. *Cell* 1993; 74: 541-54.
7. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989; 244: 1288-92.

* Invalider, inactivation sont utilisés en lieu et place du terme américain knock out.

■■■ Clonage d'un gène impliqué dans la pénétration du bacille de Koch dans les cellules. L'agent de la tuberculose, le bacille de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*), est capable d'envahir les cellules, principalement les macrophages, et d'y survivre sans être détruit par les différents systèmes bactéricides intracellulaires. La recrudescence actuelle de la tuberculose à travers le monde, avec apparition de formes multirésistantes aux antibiotiques antituberculeux utilisés aujourd'hui, a suscité une reviviscence énergique des recherches consacrées à *Mycobacterium tuberculosis*. Une équipe américaine de New York [1] vient d'obtenir un résultat important. Des fragments d'ADN de *M. tuberculosis* ont été insérés au hasard dans *Escherichia coli*. L'un des clones ainsi obtenu s'est révélé capable d'envahir des cellules humaines en culture, les cellules Hela. Le fragment ainsi cloné mesure 1535 paires de bases et il peut être divisé en deux régions, l'une de 850 bases qui semble impliquée dans la propriété de pénétration intracellulaire alors que les 695 bases restantes joueraient plutôt un rôle dans la protection de la bactérie intracellulaire contre sa destruction à l'intérieur des lysosomes. Le fragment de 1535 paires de bases comporte une séquence ouverte de lecture qui n'a que des similitudes lointaines avec d'autres protéines bactériennes, par exemple avec l'invasine de *Yersinia pseudotuberculosis* et d'autres protéines également associées à l'invasivité. Cette séquence pourrait coder pour un polypeptide de 52 kDa synthétisé par les *E. coli* recombinés et cessant d'être synthétisé lorsque le fragment d'ADN de *M. tuberculosis* a été muté par l'introduction d'un décalage de phase de lecture de 2 nucléotides. Il n'est, malheureusement, pas encore possible de vérifier que l'inactivation de ce gène dans *M. tuberculosis* en réduit la virulence: c'est qu'on ne sait pas encore transformer cette bactérie et produire

des mutations dirigées de son génome. Il n'empêche que ce résultat constitue un premier accès à des séquences du bacille tuberculeux impliquées dans leur virulence. [1. Arruda S, *et al. Science* 1993; 261 : 1454-7].

■■■ **Le rôle de la *terminal transferase* dans l'expression du répertoire de TcR (*T cell receptor*).** Dans une brève très récente (*m/s n° 10, vol. 9, p. 1127*), nous avons rapporté qu'en l'absence de *terminal deoxynucleotidyl transferase*, le réarrangement des segments codant pour les récepteurs des lymphocytes T était biaisé avec sur-représentation des événements associant des segments partiellement homologues. Cela a été montré grâce à d'ingénieuses expériences de transfection dans des fibroblastes; cependant, l'addition à ces fibroblastes d'un vecteur d'expression commandant la synthèse de la *terminal transferase* permettait de considérablement diminuer ce biais, probablement en masquant les homologies entre les extrémités des segments à réarranger par addition aléatoire de nucléotides en 3'. Cette addition forme les régions N, facteur de diversité supplémentaire. Deux laboratoires, l'un de Boston (MA, USA) [1] et l'autre de Strasbourg (France) [2] confirment maintenant complètement ces expériences par la technique du *knock-out* de gènes par recombinaison homologue. Dans les deux cas, le gène codant pour la *terminal transferase* a été inactivé. D. Komori *et al.* [1] ont injecté des cellules souches embryonnaires ES homozygotes pour la mutation insertionnelle du gène de la *terminal transferase* dans des blastocystes issus d'une souris rendue, également par recombinaison homologue, déficiente en l'activité RAG-2. RAG-1 et RAG-2 sont des gènes indispensables à la recombinaison normale des segments formant les récepteurs des lymphocytes T et les immunoglobulines. Par conséquent, les souris

RAG-2^{-/-} sont incapables de réarranger leurs gènes codant pour le TcR et les seuls lymphocytes mûrs obtenus chez les animaux chimères sont issus des cellules ES TdT^{-/-} (déficientes en *terminal deoxynucleotidyl transferase*), RAG-2^{+/+}. L'approche de S. Gilfillan, du laboratoire de Diane Mathis et Christophe Benoit (LGME, Strasbourg, France) [2] a, plus classiquement, consisté en la production de souris adultes TdT^{-/-} dont le phénotype et le développement sont rigoureusement normaux, de même que l'aptitude à répondre à une stimulation antigénique des systèmes lymphocytaires B aussi bien que T. Les résultats publiés dans les deux articles sont tout à fait convergents: le déficit en *terminal transferase* n'empêche pas du tout un réarrangement productif des segments de gènes TcR. Cependant, ces gènes réarrangés sont totalement, ou presque totalement, dépourvus de région N. De plus, la séquence des gènes réarrangés fait apparaître un biais très important en faveur de la recombinaison de segments présentant des homologies au niveau de leurs extrémités. La *terminal transferase* est donc un élément essentiel de la recombinaison des gènes TcR, augmentant la diversité par la production des régions N, et évitant un biais trop important dû à la recombinaison préférentielle entre des segments homologues.

[1. Komori T, *et al. Science* 1993; 261 : 1171-5.]

[2. Gilfillan S, *et al. Science* 1993; 261 : 1175-8.]

■■■ **L'impact des isoformes de la lipoprotéine (a) dans l'athérosclérose et la thrombose.** Un taux élevé de Lp(a) est considéré comme un facteur majeur et indépendant de risque cardiovasculaire. La Lp(a) se singularise des LDL par la présence d'une apolipoprotéine particulière, l'Apo(a), qui possède une forte homologie structurale avec le plasminogène. Des études récentes [1, 2] portant, d'une part, sur des plas-

mas riches en Lp(a) et, d'autre part, sur une forme d'Apo(a) obtenue par technologie recombinante, ont permis de mettre en évidence une corrélation entre la liaison de la Lp(a) à la fibrine et une diminution de l'activité fibrinolytique, facteur de risque de thrombose. Ces résultats s'expliquent clairement par un phénomène de compétition entre le plasminogène et la Lp(a) au cours de la fibrinolyse. Cela constitue la base biochimique du rôle possible de cette particule dans le développement des processus d'athérosclérose et de thrombose. Cependant, l'existence d'une diversité fonctionnelle de la Lp(a) a été évoquée au vu des résultats obtenus avec des plasmas riches en Lp(a) mais sans aucun effet sur la fibrinolyse. L'équipe d'E. Anglés-Cano vient de démontrer qu'en effet il existe une hétérogénéité fonctionnelle entre les isoformes de Lp(a) dans la compétition vis-à-vis du plasminogène pour la liaison à la fibrine [3]. Ces auteurs ont également démontré que cette hétérogénéité fonctionnelle est associée à l'hétérogénéité structurale bien connue de l'Apo(a). Le nombre variable de structures modulaires qui composent l'Apo(a), les domaines kringle homologues au kringle 4 du plasminogène, définissent la taille des isoformes et leur comportement fonctionnel: les isoformes de faible masse moléculaire semblent avoir l'effet le plus prononcé sur la fibrinolyse. Cet effet est étroitement lié à l'affinité des différentes isoformes d'Apo(a) pour la fibrine et est directement proportionnel à la quantité de Lp(a) liée. Désormais, en plus de l'effet quantitatif, un effet qualitatif important lié aux isoformes d'Apo(a) doit être considéré dans le rôle athérogène et thrombogène de la Lp(a).

[1. Rouy D, *et al. Arterioscler Thromb* 1991; 11 : 629-38.]

[2. Rouy D, *et al. Biochemistry* 1992; 31 : 6333-9.]

[3. Hervio L, *et al. Blood* 1993; 82 : 392-7.]