médecine/sciences 1990 ; 6 : 76

La lecture directe d'une séquence d'ADN au microscope sera-t-elle demain possible ?

L'imagerie haute résolution a considérablement progressé depuis six ans, date à laquelle fut créé le microscope à effet tunnel, dont nous avons rapporté le principe et les premières applications en biologie dans *m/s* (*m/s, n° 7, vol. 2, p. 401, m/s, n° 7, vol. 4, p. 451 et m/s, n° 5, vol. 5, p. 345*). Les problèmes spécifiques aux molécules biologiques sont principalement liés à leur faible conductivité, ce qui a conduit dans un premier temps à la nécessité de les ombrer, pratique obligatoire en microscopie électronique et qui exclut la possibilité d'analyse en milieu liquide, et donc *in vivo*. Puis des molécules d'ADN déposées sur une surface d'or ou de graphite ont pu être visualisées avec assez de précision pour qu'apparaissent clairement les petits et grands sillons de la double hélice [1, 2]. En modifiant le support et le traitement de la molécule à étudier de façon à favoriser tout à la fois l'accessibilité de la molécule à la sonde et sa fixation sur le support de sorte qu'elle ne puisse pas être entraînée ou déformée par le mouvement de celle-ci, une nouvelle étape vient d'être franchie par DD. Dunlap et C. Bustamante (Albuquerque, NM, USA) [3]. C'est maintenant une image directe des bases permettant de les identifier qui est obtenue. A ce jour, seule la distinction entre purines et pyrimidines est possible. Il faudra donc soit améliorer la résolution spatiale, soit marquer spécifiquement les bases avec des groupements identifiables pour parvenir à un réel séquençage de l'ADN par cette technique. Dans le cas décrit par les auteurs, un simple brin poly-A est déposé sur un graphite pyrolytique hydrophobe. Les bases reposent à plat sur le support, le reste de la molécule émergeant au-dessus de cette surface. L'arrangement des molécules de poly-A en alignements parallèles et les cycles des adénines sont parfaitement reconnus. Outre pour le séquençage par lecture directe, la sonde du microscope à effet tunnel pourrait aussi être utilisée comme un micromanipulateur dont le positionnement extrêmement précis (à 0,1 nm près) autoriserait de fines modifications des molécules [4]. Séquençage, mutagenèse et étude du vivant à l'échelle atomique seront probablement bouleversés par la microscopie à effet tunnel et ses dérivés.

P.B.

1. Lidsay SM, Thundat T, Nagahara L, Knipping U, Rill RL. Images of the DNA double helix in water. *Science* 1989 ; 244 : 1063-4.
2. Cricenti A, Selci S, Felici F, Generosi R, Gori E, Djaczenko W, Chiarotti G. Molecular structure of DNA by scanning tunneling microscopy. *Science* 1989 ; 245 : 1226-7.
3. Dunlap DD, Bustamante C. Images of single-stranded nucleic acids by scanning tunnelling microscopy. *Nature* 1989 ; 342 : 204-6.
4. Foster JS, Frommer JE, Arnett PC. Molecular manipulation using a tunneling microscope. *Nature* 1988 ; 331 : 324-6

BRÈVES

Un gène majeur responsable du bec-de-lièvre ? Le bec-de-lièvre avec ou sans fente palatine affecte environ une personne sur 1 000 dans la race blanche. Le risque de récurrence dans une famille étant beaucoup plus élevé que dans la population générale, on peut penser que des facteurs génétiques interviennent dans sa genèse. Un des modèles proposés est celui d'un gène majeur à transmission autosomique récessive modifiée par d'autres facteurs génétiques ou du milieu. Aucun argument toutefois ne permettait de soupçonner la nature du gène majeur ainsi postulé. Un groupe réunissant plusieurs équipes américaines [1] vient de franchir un premier pas. Ils ont choisi de chercher leurs gènes candidats parmi ceux qui sont connus comme intervenant dans la formation du palais chez les rongeurs. Cette hypothèse était risquée car la principale anomalie chez l'homme est la fente labiale plutôt que la fente palatine. Elle a été cependant couronnée de succès. La méthode des polymorphismes de restriction (RFLP) a clairement montré une association entre deux fragments détectés par une sonde du *transforming growth factor alpha* et la présence du bec-de-lièvre. Une anomalie dans ce *locus*, appelé TGFA, ou étroitement lié à ce *locus* (qui, rappelons-le, est situé sur le chromosome 2, en 2q22), rendrait donc compte d'un certain nombre de cas, évalué à environ un tiers, des becs-de-lièvre isolés (« non systémiques »). L'avenir dira si d'autres gènes peuvent, eux aussi, rendre compte d'une production notable de cas de fente labio-palatine qui ne peuvent être attribués au *locus* TGFA.
[1. Ardinger HH, *et al. Am J Hum Genet* 1989 ; 45 : 348-59.]

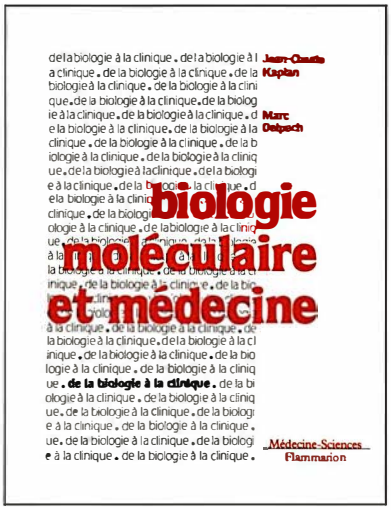
Le facteur transcriptionnel HNF-1 (aussi appelé LFB-1), activant l'expression de gènes exprimés dans le foie, possède un domaine POU de liaison à l'ADN. La protéine *hepatocyte nuclear factor 1* (HNF-1) est un activateur transcriptionnel spécifique des promoteurs de gènes exprimés au cours de la différenciation hépatique. Son ADNc a récemment été cloné par Monique Frain, travaillant dans le laboratoire de Ricardo Cortese à l'EMBL (Heidelberg, RFA). La méthode utilisée a été de purifier d'abord la protéine par chromatographie d'affinité sur une colonne à laquelle ont été liés des éléments d'ADN qui représentent les sites de fixation de HNF-1. Puis, cette protéine a été très partiellement soumise à un microséquençage des acides aminés, et des oligonucléotides ont été synthétisés d'après cette séquence protéique ; ils ont alors été utilisés comme sondes pour cribler une banque d'ADNc de foie et isoler un clone contenant l'ADN spécifique de HNF-1. La séquence protéique déduite de celle de l'ADNc permet de montrer que la région de HNF-1 impliquée dans la liaison à sa cible ADN était du type POU (*m/s, n° 3, vol. 5, p. 172*), c'est-à-dire possédait un domaine de type « boîte homéo » à côté du motif « POU spécifique ». Nous renvoyons le lecteur intéressé... mais effrayé par cette avalanche de sigles barbares, aux études déjà publiées dans *m/s* sur les facteurs de transcription, la liaison des protéines à l'ADN... et, notamment, les motifs homéo d'abord décrits dans des gènes homéotiques de drosophile (*m/s Lexique Immunologie, suppl. au n° 1, vol. 5, p. 30, 33, 36, 39*).
[Frain M, *et al. Cell* 1989 ; 59 : 145-57.]

Création de la diversité des chaînes lourdes des anticorps chez la poule : il s'agit également d'une hyperconversion. Nous avons antérieurement rapporté comment était créée la diversité des chaînes légères d'anticorps de poule : par un mécanisme d'hyperconversion génique, une série de pseudogènes servant de « donneur de séquence » à un segment V_λ fonctionnel unique (codant pour la région variable de la chaîne V_λ des immunoglobulines) (*m/s, suppl. au n° 1, vol. 5, p. 11*). Le même mécanisme est utilisé en ce qui concerne les chaînes lourdes avec, ici, la participation des segments D au phénomène d'hyperconversion [1]. Claude-Agnès Reynaud de l'équipe de Jean-Claude Weill (maintenant à l'Institut d'immunologie de Bâle, Suisse) vient en effet de montrer avec ses collègues qu'il n'existait, avant différenciation des lymphocytes dans la bourse de Fabricius, qu'un seul segment V_H fonctionnel (codant pour la région variable des chaînes lourdes) et près d'une centaine de pseudogènes dispersés sur 60 à 80 kpb en amont du segment codant. Entre V_H et la région du gène codant pour les segments variables, on trouve une quinzaine de segments D (de diversification) (*m/s, suppl. au n° 1, vol. 5, p. 5*). Cependant la contribution de ces multiples segments à la diversification des anticorps au cours de l'ontogenèse des lymphocytes B semble modérée comparée, là encore, aux phénomènes de conversion dans lesquels les pseudogènes, qui sont en fait des segments VD, jouent également le rôle de donneurs de séquence.
[1. Reynaud CA, *et al. Cell* 1989 ; 59-171-83.]

Mutation des prions dans la maladie de Creutzfeldt Jakob. Les prions sont des protéines (PrP) qui s'accumulent dans le système nerveux au cours d'encéphalopathies dégénératives. Leur chaîne compte 245 acides aminés et leur gène est localisé sur le chromosome 20 (*m/s n° 10, vol. 2, p. 588*). Les prions sont trouvés en quantité anormale dans la tremblante du mouton et de la chèvre, et dans trois maladies humaines, kuru, maladie de Creutzfeldt-Jakob et syndrome de Gerstmann-Sträussler. Dans plusieurs familles atteintes de ce dernier syndrome, qui est transmis comme un caractère autosomique dominant, une même mutation, $pro^{102} \rightarrow$ leu, a été trouvée à l'état hétérozygote (*m/s n° 6, vol. 5, p. 429*). Nous faisions alors l'hypothèse que la maladie de Creutzfeldt-Jakob, qui ne présente pas cette mutation, pourrait recéler des prions altérés de façon différente. A peine quelques mois plus tard, une équipe du NIH (Bethesda, MD, USA) annonce, dans un travail préliminaire [1], qu'elle a identifié une mutation siégeant au codon 129 et se traduisant par le remplacement d'une méthionine par une valine. Contrairement au cas du syndrome de Gerstmann-Sträussler, la mutation doit frapper les deux allèles pour être associée à une maladie clinique. Elle a été trouvée dans deux cas de kuru sur trois, dans trois cas sur trois des formes familiales de Creutzfeldt-Jakob analysées, et dans deux cas sur deux liés à un traitement par de l'hormone de croissance contaminée. Elle n'a pas été trouvée à l'état homozygote dans 15 cas de forme sporadique de la maladie ni chez les témoins.
De ce travail on peut conclure qu'une même mutation homozygote chez sept sujets atteints de kuru ou de Creutzfeldt-Jakob peut être la base génétique de certains cas de ces affections. Il reste à savoir si cette relation est causale, et à découvrir la base moléculaire des formes sporadiques.
[1. Goldfarb LG, *et al. Am J Hum Genet* 1989 ; 45 (suppl.) : A 189.]

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET MEDECINE

Le premier ouvrage qui dresse le bilan des applications du génie génétique à la médecine.



Jean-Claude KAPLAN - Marc DELPECH
1989, un volume broché.
Collection : « De la biologie à la clinique ».
636 pages, 307 schémas inédits en 2 couleurs.
ISBN : 2-257-10488-9. Prix : **400 FF.**

Diagnostic prénatal de certaines maladies héréditaires, déchiffrage du virus du SIDA, découverte des oncogènes, voici quelques uns des succès spectaculaires obtenus grâce au génie génétique. **Cet ouvrage sans équivalent, destiné à tous les médecins** rapporte les avancées les plus récentes des applications de la biologie moléculaire à la médecine.

- Plus de 300 schémas inédits renforcent le texte.
- Des tables détaillées constituent une précieuse base de données.
- Un glossaire complet sur tous les termes employés en biologie moléculaire clôt le volume.
- **Les concepts, les applications et les méthodologies de la biologie moléculaire rassemblés pour la première fois en un seul ouvrage.**

Médecine-Sciences
Flammarion

Cet ouvrage est en vente en librairie ou par correspondance

BON DE COMMANDE

Nom _____ Prénom _____

Adresse _____

_____

Je désire recevoir **Biologie Moléculaire et Médecine** au prix de :
400 FF + 30 FF de frais de port, soit 430 FF.
Ci-joint mon règlement à l'ordre de Librairie Flammarion 4 - Département VPC
26, rue Jacob - 75006 PARIS.

Réf. AM 32/89

Le rejet d'un greffon médullaires par les cellules NK (*natural killer*) dépend de l'expression de molécules de classe I du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Le rejet de greffons cutanés (et probablement de nombreux autres types de greffon) obéit aux lois classiques de la transplantation, dépendant d'un mécanisme qui implique la reconnaissance par le récepteur T d'une molécule du CMH non exprimée par les cellules de l'organisme receveur. En revanche, d'autres mécanismes sont également en jeu dans le rejet des greffons de moelle osseuse, principalement l'attaque par les cellules NK [1]. Cette reconnaissance des cellules greffées par les cellules NK du receveur dépend de gènes liés au CMH. Des travaux d'équipes suédoises (Karolinska Institute, Stockholm) et américaines (West Haven, CT ; Yale, CT ; Rockville, MD) viennent, grâce à l'utilisation des souris transgéniques, de démontrer que les gènes de classe I contrôlaient eux-mêmes le rejet du greffon par les cellules NK, selon des lois propres différentes des règles classiques de la transplantation [2]. Des greffons médullaires de souris C57BL/6 (lignée B6) sont rejetés par tout animal exprimant la molécule $H2D^d$ appartenant à la classe I du CMH. La lignée B6 transgénique par introduction d'un fragment d'ADN codant pour la molécule $H2D^d$ (lignée B8) a, en revanche, une moelle qui est tolérée par les animaux exprimant cette molécule. Les souris B8, cependant, rejettent les greffons B6, alors que la seule différence entre ces deux lignées est l'expression du transgène $H2D^d$ chez le receveur B8. Ce rejet est inhibé par le traitement du receveur à l'aide d'anticorps anti-cellules NK. Un greffon B8 est également rejeté par un receveur B6, selon, cette fois, les règles habituelles de la transplantation ; il semble pourtant que, dans ce rejet aussi, les cellules NK jouent un rôle important. Ces travaux aboutissent à des conclusions très claires et d'une très grande importance théorique (pour comprendre le système d'activation des cellules NK) aussi bien que pratique (pouvant aboutir à l'édiction de nouvelles règles concernant les greffes de moelle) : les cellules NK reconnaissent les cellules étrangères sur la base d'une différence dans les molécules de classe I exprimées, aussi bien lorsque le greffon possède des molécules du CMH absentes chez le receveur (selon les règles classiques) que lorsque, au contraire, il ne possède pas des molécules du CMH présentes chez le receveur.

[1. Murphy WJ, *et al. J Exp Med* 1987 ; 166 : 1499-510.]
[2. Öhlen C, *et al. Science* 1989 ; 246 : 666-8.]

Le syndrome de Gilles de la Tourette est une affection génétique très répandue, puisque la fréquence du gène semble de l'ordre de 1 % et que la transmission est dominante autosomique. Les symptômes, souvent difficiles à percevoir en raison de la possibilité pour le malade de les supprimer momentanément, sont marqués par un début précoce, des tics moteurs et vocaux, et des troubles variés du comportement. Une tentative de localisation du gène a été faite par Comings *et al.* [1] (Duarte, CA, USA). Le point de départ était la constatation d'un taux faible de tryptophane et de sérotonine orientant vers la tryptophane oxygénase. Partant d'un clone de rat, ils ont pu localiser le gène humain sur le chromosome 4 en 4p31. Ils ont d'autre part trouvé une liaison avec l'alcoolisme « de type II », décrit par Cloninger [2] comme survenant chez des sujets jeunes, agressifs, peu anxieux et très difficiles à sevrer, avec la tendance à l'abus des drogues et certaines formes de dépression. Ils ont été conduits à suggérer qu'un même gène pourrait gouverner la tryptophane oxygénase, le *locus* présomptif du syndrome de Tourette, un facteur favorisant l'alcoolisme de type II et une forme de dépression. La localisation du gène d'une maladie aussi fréquente aurait une grande importance ; il s'agit pour le moment d'une intéressante hypothèse de travail qui demande confirmation.

[1. Comings DE, *et al. Am J Hum Genet* 1989 ; 45 (suppl) : A135.]
[2. Cloninger CR. *Science* 1987, 236 : 410-6.]

La cholécystokinine (CCK) provoque la satiété en se fixant sur des neurones centraux. Le peptide CCK est présent dans l'ensemble de l'organisme, y compris dans le système nerveux central où il est considéré comme un neuropeptide. L'injection systémique du peptide produit la satiété et diminue nettement l'ingestion alimentaire, mais l'on ne savait pas jusqu'alors à quel niveau dans l'organisme se situait l'origine de ces effets. Dourish *et al.* [1] démontrent que cette action dépend de récepteurs situés sur des neurones centraux. Le CCK a deux types de récepteurs, B dans le cerveau, A dans le reste de l'organisme. Des antagonistes spécifiques de ces deux récepteurs ont été produits, qui tous deux provoquent un accroissement de l'ingestion alimentaire et un délai dans la satiété. L'antagoniste du récepteur CCK-B (neuronal) est cependant 100 fois plus puissant que celui qui agit sur le récepteur CCK-A. Il est probable que ce traitement affecte essentiellement des neurones hypothalamiques (dans le noyau paraventriculaire ou ventromédian) dont le rôle dans le sentiment de faim est connu. Les autres suggèrent que le développement, pour la recherche, de ces outils pharmacologiques pourrait éventuellement déboucher sur une utilisation thérapeutique. C'est peut-être réduire un peu rapidement le comportement alimentaire de l'homme à un mécanisme primaire d'intégration neuro-humoral, ce que contredit la plus simple analyse psychologique !

[1. Dourish CT, *et al. Science* 1989 ; 245 : 1509-11]