Le courrier du CNRS 41

Auteur(s) : CNRS

Les folios

En passant la souris sur une vignette, le titre de l'image apparaît.

50 Fichier(s)

Les relations du document

Ce document n'a pas de relation indiquée avec un autre document du projet.

Citer cette page

CNRS, Le courrier du CNRS 41, 1981-07

Valérie Burgos, Comité pour l'histoire du CNRS & Projet EMAN (UMR Thalim, CNRS-Sorbonne Nouvelle-ENS)

Consulté le 29/08/2025 sur la plate-forme EMAN :
https://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136

Présentation

Date(s)1981-07
Mentions légalesFiche : Comité pour l'histoire du CNRS ; projet EMAN Thalim (CNRS-ENS-Sorbonne nouvelle). Licence Creative Commons Attribution – Partage à l'Identique 3.0 (CC BY-SA 3.0 FR).
Editeur de la ficheValérie Burgos, Comité pour l'histoire du CNRS & Projet EMAN (UMR Thalim, CNRS-Sorbonne Nouvelle-ENS)

Information générales

LangueFrançais
CollationA4

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Informations éditoriales

N° ISSN0153-985x

Description & Analyse

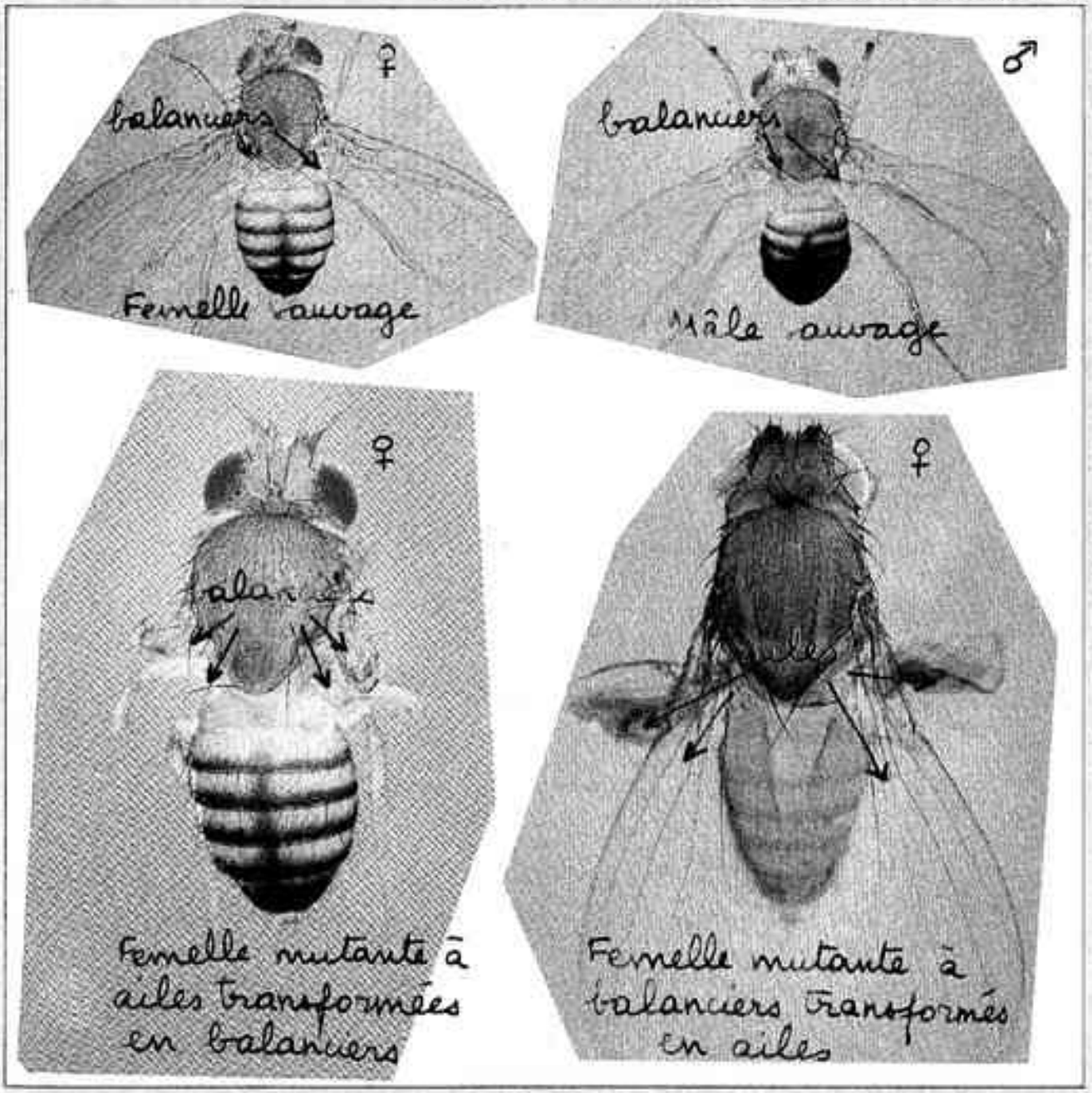
Nombre de pages50
Notice créée par Valérie Burgos Notice créée le 05/10/2023 Dernière modification le 06/12/2024

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

LE COURRIER DU CNRS

CNRS
Dépot des archives
de la Délégation Paris Michel-Ange
Bâtiment 19
1, avenue de la Terrasse
91198 GIF-sur-Yvette

La génétique au CNRS Trimestriel : n° 41 - Juillet 1981 - 15 F.



Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

le courrier du CNRS

Centre national de
la recherche scientifique
15, quai Anatole France
75700 Paris - Tél. : 555.92.25

Directeur de la publication
Wladimir Mercouroff

Secrétaire de rédaction
Martine Chabrier-Elkik

La vie des laboratoires
Véronique Brossollet

Entretiens
Monique Mounier

Comité de rédaction
Martine Barrère, Michel Crozon,
Jean-Didier Dardel, Francis Garnier,
Alain Giraud, Lucien Hartmann,
James Hiéblot, Jacqueline Mirabel,
Geneviève Niéva, Henri Peronnin,
Jean-Claude Ribes, Janine Rondest

Direction artistique
Guy Clergironnet
Industrie Service

Trimestriel : n° 41 - Juillet 1981 - 15 F.

Ce numéro a été réalisé
avec la collaboration de
Catherine Laurent et de
Jean Tavlitzki.

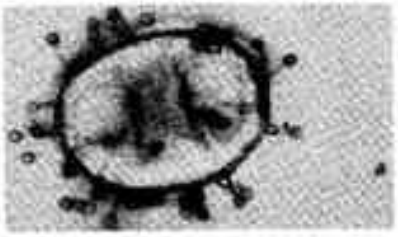
Page 1 de couverture : Drosophiles (voir p. 25-26). Les drosophiles mutantes sont représentées à plus grande échelle que les drosophiles sauvages. – (Cliché Inge Erk et Claude Maisonhaute).
Page 4 de couverture : Interprétation couleur d'un caryotype d'un homme normal (voir p. 45). – (Cliché Roland Berger).
Les illustrations de ce numéro ont été réalisées par Martine Lemonnier.

La génétique au CNRS
Roger Monier 4

Souvenirs
André Lwoff 5

Génétique formelle, génétique moléculaire
Jean Tavlitzki 7

La génétique microbienne 14
Maxime Schwartz



Des gènes dans les mitochondries
Piotr Slonimski 18

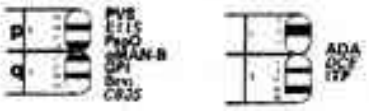
La drosophile, hier et aujourd'hui
Madeleine Gans, Nicole Prud'homme 22

Une génétique adaptée aux cellules d'organismes supérieurs : la génétique somatique
Gérard Buttin 32

De la génétique somatique à l'étude des cancers
Jacques Jami 37

Des cellules hybrides pour étudier la différenciation cellulaire
Mary Weiss 40

La cartographie des gènes humains
Marc Fellous 45



La définition et la reconnaissance du "soi"
Jean Dausset 51

Abonnements et ventes au numéro, le numéro 15 F. Abonnement annuel : 45 F (voir bulletin p. 27-31). Tout changement d'adresse doit être signalé au secrétariat de rédaction. Nous remercions les auteurs et les organismes qui ont participé à la rédaction de ce bulletin. Les intertitres et les chapeaux introductifs ont été rédigés par le secrétariat de rédaction. Les textes et illustrations peuvent être reproduits sous réserve de l'autorisation du directeur de la publication – C.P.A.D. 303 – Réalisation ALLPRINT, 8 rue Antoine Chantin, 75014 Paris – ISBN 2-222-02911-2 – © Centre national de la recherche scientifique

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

La génétique au CNRS

Roger MONIER

Née dans la seconde moitié du XIXe siècle du génie du moine Grégor Mendel qui unissait en lui les connaissances techniques de l'horticulteur et la science du biologiste, la génétique, ou science de l'hérédité, a pris un essor rapide au début du XXe siècle, en raison de l'importance qu'elle revêt à la fois pour la biologie et pour l'économie. En dévoilant, grâce à une approche mathématique rigoureuse, les lois qui gouvernent la transmission des caractères héréditaires des parents à leurs descendants, la génétique classique a ouvert la voie aussi bien à une explication de la théorie de l'évolution qu'à des techniques efficaces d'amélioration des plantes cultivées et des animaux d'élevage.

D'abord limitée à l'étude d'êtres vivants entre lesquels des croisements inter- ou intraspécifiques sont possibles et qui peuvent être élevés et observés sous forme de populations suffisamment nombreuses pour permettre l'analyse statistique, la génétique classique devait évoluer dans la seconde moitié du XXe siècle pour donner naissance à la génétique moléculaire.

Ses objets d'étude favoris deviennent alors les microorganismes et les virus, qui offrent la possibilité d'unir l'étude de l'hérédité à celle des métabolismes. Etroitement associée dès lors à la biochimie dans une discipline nouvelle, la biologie moléculaire, l'analyse génétique n'est plus seulement susceptible d'éclairer les mécanismes de l'hérédité. Elle permet au biologiste d'intervenir par l'intérieur dans la vie des organismes, grâce à l'isolement et à l'étude, à la fois génétique et biochimique, de mutants appropriés. A la condition de disposer d'un matériel biologique qui permette d'associer une approche morphologique et physiologique de l'organisme entier à une étude physicochimique et biochimique de ses constituants élémentaires, le biologiste peut ainsi prétendre aborder l'étude des phénomènes vitaux les plus complexes en dépassant la vieille querelle du réductionnisme.

Enfin, dans ces toutes dernières années, la découverte des enzymes de restriction bactériens et du mécanisme de leur action dégradative sur l'acide désoxyribonucléique a donné naissance au génie génétique, qui permet de recombiner en tube à essai des fragments de chromosomes, et qui peut conduire à la fois à l'analyse moléculaire du génome des organismes supérieurs et à des applications biotechnologiques d'un grand avenir.

Rien ne pouvait être plus approprié que d'ouvrir le numéro du Courrier du CNRS sur la génétique par un article consacré au regretté Boris Ephrussi. Comme le rappelle opportunément le professeur A. Lwoff, Boris Ephrussi peut être en effet considéré comme le père de l'Ecole française de génétique. Directeur du laboratoire de génétique physiologique du CNRS, créé en 1946, il devait recevoir la Médaille d'or du CNRS en 1968. Il a lui-même contribué efficacement à la transition de la génétique classique à la génétique moléculaire. Ses travaux sur la génétique des levures ont joué un rôle important dans l'étude de la transmission des caractères héréditaires non contrôlés par le génome nucléaire. Enfin, il a été l'un des premiers à percevoir l'intérêt génétique de la découverte, réalisée en France en 1962 par G. Barski, du phénomène de fusion cellulaire, qui a permis de fonder la génétique somatique.

L'effort du CNRS dans le domaine de la génétique est loin d'être négligeable. En effet, à côté de cinq laboratoires propres, dont la vocation est essentiellement génétique et qui regroupent cent quatre-vingt-quatre chercheurs, dont soixante-dix-huit chercheurs CNRS, environ trente formations propres et associées consacrent au moins une partie de leurs activités à l'essor de la génétique française. Au total, on peut estimer qu'environ trois cent quatre-vingt-dix chercheurs, dont cent cinquante appartiennent au CNRS, et trois cent dix ITA, dont deux cent trente du CNRS, y contribuent.

En outre, quatre actions thématiques programmées viennent en 1981 conforter cette action, puisque soit la totalité des moyens dans le cas de l'ATP « Biologie moléculaire du gène », soit une partie dans le cas des ATP « Souris », « Bases biologiques de la production végétale » et « Microbiologie » sont destinées à des contrats à finalité génétique.

Grâce à ces contributions, la génétique française a acquis une audience internationale ainsi qu'en témoignent les articles rassemblés dans ce numéro spécial. Néanmoins, la nécessité d'introduire plus largement encore l'approche génétique dans tous les domaines de la biologie fondamentale et l'urgence de développer les applications du génie génétique et des biotechnologies, qui requièrent en particulier une connaissance approfondie de la biologie moléculaire des microorganismes, amènent à considérer que le CNRS devrait accroître notablement les moyens destinés au soutien de la génétique dans les prochaines années.

□ Roger Monier est directeur scientifique du CNRS pour le secteur des sciences de la vie.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Souvenirs

André LWOFF

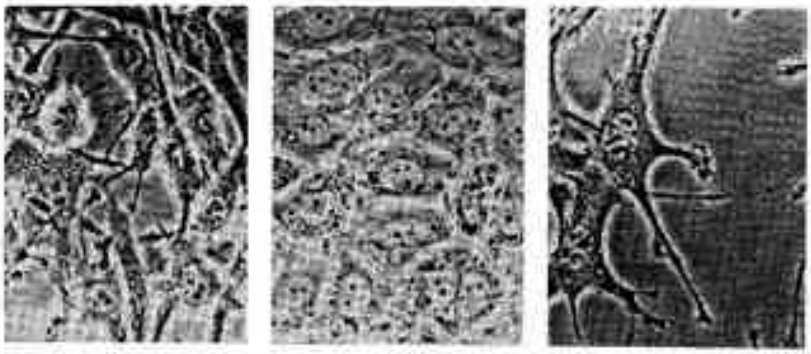
C'est le sept avril 1979 que j'ai vu Boris Ephrussi pour la dernière fois à l'hôpital de la cité universitaire. Depuis de nombreux mois, sa santé s'était gravement altérée. Il pressentait sa mort, et faisait face avec courage. Nous avions fait connaissance en novembre 1920. Nous préparions l'un et l'autre à la Sorbonne le certificat de zoologie et nous nous étions rencontrés au cours d'anatomie comparée donné par Georges Pruvot. Nous étions peu nombreux, une trentaine. Il était de tradition que les étudiants en zoologie fassent un stage à la station de biologie marine de Roscoff. De nombreux biologistes y travaillaient pendant les vacances d'été ; Boris et moi devions nous y retrouver régulièrement au cours des années, étudiants d'abord, chercheurs ensuite.

Boris parlait peu de sa vie en Russie. J'appris cependant que sa famille y avait vécu dans une relative aisance et qu'après avoir terminé ses études secondaires, il avait passé un an à l'Ecole des Beaux-Arts ; car il dessinait fort bien. Finalement après avoir hésité entre l'art et la science, il avait choisi la science, la biologie. Il avait émigré en

□ André Lwoff est professeur honoraire à l'Institut Pasteur.

Boris Ephrussi.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf



De gauche à droite: fibroblastes de souris, cellules hépatiques de rat et cellules hybrides obtenues par fusion des deux types de cellules précédents. (Centre de génétique moléculaire de Gif-sur-Yvette).

France après la révolution et y avait connu des temps très difficiles jusqu'à ce qu'une bourse de la Fondation Rockefeller lui assure les moyens de vivre modestement pendant trois ans.

La station de biologie marine de Roscoff était un lieu de rencontre pour des chercheurs œuvrant dans des disciplines diverses. Boris y rencontra entre autres, Victor Henri, Harold Fox, René Wurmser, Jean Cantacuzène, Edouard Chatton, Robert Courrier, Marcel Prenant, Georges Teissier, Louis Rapkine. Roscoff était aussi fréquenté par de brillants représentants des écoles d'embryologie belge et suédoise. Roscoff était toujours un petit village ; le laboratoire constituait un monde clos ; tous se connaissaient et se retrouvaient durant les excursions zoologiques dans les îles de la baie de Morlaix, pendant les conférences, au cours des repas, au café, ou au tennis. Le laboratoire était un lieu privilégié où les jeunes chercheurs pouvaient rencontrer d'éminentes personnalités. Ces rencontres jouèrent un rôle décisif dans la carrière de nombreux scientifiques : c'est à Roscoff que débuta la collaboration entre Boris Ephrussi et Louis Rapkine.

En 1920, la licence de « Sciences naturelles » de la Sorbonne comprenait les certificats de zoologie, de botanique et de géologie ou de minéralogie. Sans doute, le certificat de botanique comportait-il un enseignement de physiologie végétale, mais l'on pouvait devenir licencié ès-sciences en ignorant à peu près tout de la biochimie et de la génétique. Heureusement, il y avait Roscoff ! Louis Rapkine était un excellent biochimiste et ce fut lui qui convainquit Jacques Monod des possibilités offertes par la biochimie, lui aussi qui ouvrit à Boris Ephrussi la voie de l'embryologie chimique. Le travail de Louis Rapkine et de Boris Ephrussi portait sur l'évolution des constituants de l'œuf d'oursin au cours du développement. Ce fut pour Boris une initiation et le premier épisode biochimique de sa carrière. Cette nouvelle orientation sera décisive. Quelques années plus tard, George Beadle engagea Boris dans la voie de la génétique biochimique ; il fut à l'origine du travail désormais classique sur les pigments oculaires de la drosophile.

Ils démontrèrent que la synthèse du pigment est gouvernée par une série de gènes, chacun intervenant dans une réaction déterminée de la séquence biosynthétique. Le succès du travail dépendait de la réussite de la transplantation de disques imaginaux, et Boris joua là un rôle déterminant.

Plus tard, Boris Ephrussi obtint, chez la levure de boulangerie, l'inactivation irréversible des mitochondries par l'acriflavine. Ces mutants « petite colonie » furent la base de la collaboration avec Piotr Slonimski. Là, c'était le généticien qui avait ouvert la voie au biochimiste.

Au printemps 1936, Boris Ephrussi s'apprêtait à partir pour un séjour d'une année dans le groupe de T.H. Morgan, à l'Institut de technologie de Californie ; à cette même époque, Jacques Monod se préparait à participer pour la seconde fois à une expédition au Groënland sur le « Pourquoi pas ». Boris avait rencontré Jacques à Roscoff, il connaissait ses dons. Il convainquit Jacques de l'importance de la génétique et obtint pour lui une bourse Rockefeller : ils partirent ensemble à Pasadena. Cette année-là, le « Pourquoi pas » se perdit corps et biens au large des côtes du Groënland. Boris Ephrussi – et la génétique – avait sauvé la vie de Jacques Monod.

L'essentiel de la vie professionnelle de Boris Ephrussi se déroula en France ; son influence sur le développement de la génétique et de la biologie moderne en France est peu connue à l'étranger. Son enseignement était de très grande qualité et les travaux pratiques qu'il concevait pour les étudiants étaient matière à raisonnement. Ses cours de génétique étaient et restent parmi les meilleurs cours de biologie donnés à la faculté des sciences. L'Ecole française de génétique est l'œuvre de Boris Ephrussi. Boris Ephrussi a eu une pléiade de collaborateurs, de disciples. Il a formé, orienté, guidé, beaucoup de chercheurs et a été pour eux un maître à penser. Son influence est liée au fait qu'il dominait l'ensemble de la génétique et de la biologie ; il avait l'art de discerner l'essentiel de l'accessoire, de poser les problèmes majeurs. Il avait le sens de l'essentiel.

Et puis et surtout, il aimait discuter, argumenter, convaincre. Son talent de dialecticien, son maniement du discours, dépassaient le cadre de la science. Boris Ephrussi possédait au plus haut degré l'art du conteur. Les moindres événements prenaient, de par son verbe, un relief et une couleur saisissants. Il est vraiment dommage qu'il n'ait pas écrit ses souvenirs et ses réflexions. Plusieurs fois, sans succès, j'ai essayé de le convaincre. Il n'aimait pas écrire, il aimait parler. Parler de sa voix grave, chaude et bien timbrée qui avait conservé de savoureuses intonations slaves. Le papier ne l'inspirait pas ; il avait besoin d'un interlocuteur ou d'un auditoire. Cet auditoire, il l'avait en face de lui lorsqu'il donnait un cours. Il fut un excellent enseignant : présence, clarté, rigueur, sont les qualités majeures d'un professeur.

La vie de Boris Ephrussi a été entièrement consacrée à la recherche. Il a aimé son métier avec passion. Comme tous les passionnés, il était inquiet, tourmenté et il possédait à un haut degré l'art de transmettre ses tourments à son entourage – qui en a souffert probablement plus que lui-même –. En raison de sa personnalité très forte et dominatrice, certains de ses collaborateurs ont recherché l'indépendance ; mais tous ceux qui l'ont quitté ont conservé pour leur maître, respect, admiration, reconnaissance et affection, une affection très profonde dont j'ai souvent perçu les échos et qui s'est manifestée tout particulièrement ces derniers jours.

Grand scientifique et grand savant, personnalité originale, attachant et séduisant, Boris Ephrussi mériterait de devenir le personnage central d'un roman qui ne sera malheureusement jamais écrit.

Allocution prononcée à l'occasion des obsèques de Boris Ephrussi.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Génétique formelle, génétique moléculaire

Qu'il analyse la variabilité de caractères macroscopiques ou biochimiques ou les modifications structurales des acides nucléiques qui les déterminent, le généticien a toujours le même objectif : comprendre les mécanismes qui fondent les propriétés des êtres vivants. De cette double approche, et des succès qui en résultent, l'auteur en hommage à Boris Ephrussi dont il fut l'élève, nous porte un témoignage.

Jean TAVLITZKI

De tous les systèmes que nous connaissons, seuls les êtres vivants ont la capacité de se reproduire semblables à eux-mêmes, de transmettre leurs caractères à leur descendance, de leur transmettre aussi toute modification de leur patrimoine génétique.

Ils sont également les seuls capable de transformer les molécules dénuées de spécificité qu'ils trouvent dans leur alimentation, d'en extraire l'énergie et de construire à partir de ces molécules des assemblages fonctionnels organisés qui leur sont propres, assurant la permanence de tout individu et transmettant à leur descendance cette même capacité.

Unité et diversité des êtres vivants

L'objet de la génétique est d'élucider la nature des mécanismes qui fondent ces deux propriétés que seuls les besoins de l'analyse conduisent à dissocier. Sa démarche passe par l'étude de l'aptitude qu'ont les êtres vivants à subir des variations qui sont héréditaires. Son succès vient de ce qu'à l'origine de chacune de ces variations, produite par une mutation, il n'y a en général modification que d'une seule de ces sous-unités fonctionnelles du patrimoine génétique que sont les gènes, tout le reste étant égal d'ailleurs. Amplifiée, cette modification apparaît comme un caractère nouveau accessible à l'observation et à l'expérimentation.

La génétique se présente donc d'abord comme l'étude de ce qui est héréditaire dans la variabilité. Cette dernière saute aux yeux quand on regarde, par exemple, une foule : aucun homme, aucune femme, n'est identique à un autre, à une autre. Et chaque enfant qui naît est un être nouveau dont il n'a jamais existé, dont il n'existera jamais d'autre exemplaire. Il en est de même pour tous les êtres vivants et même si ce polymorphisme n'est pas toujours apparent au niveau des caractères morphologiques macroscopiques, il devient patent dès que, par exemple, on analyse des extraits obtenus à partir d'un même type cellulaire prélevé chez des individus appartenant à une même espèce : on y révèlera des formes différentes d'un même enzyme, d'une même protéine (fig. 1). Il est des exceptions qui confirment la règle :

– d'une part, les vrais jumeaux qui, issus d'un même œuf, ont le même patrimoine génétique et se ressemblent... comme des jumeaux ;

– d'autre part, les animaux domestiques et les plantes cultivées qui ont été et qui sont construits en fonction de nos besoins, alimentaires ou récréatifs. Ceci à la suite de croisements répétés qui ont eu, et qui ont pour effet de leur imposer le même patrimoine génétique.

Sous-jacente à cette extraordinaire variabilité qui caractérise les populations naturelles, comme le sont par exemple les populations humaines, la génétique, la biochimie et, produit de leur fusion, la génétique (ou biologie) moléculaire, découvrent une profonde unité : unité de composition, unité de structure, unité de fonctionnement. Ce sont chez tous les organismes, comme chez tous les virus, les mêmes quatre bases nucléiques, adénine, guanine, thymine, cytosine, qui forment les acides désoxyribonucléiques (ADN), dont les segments constituent autant de gènes définis par l'ordre dans lequel ces bases y sont disposées. Ce sont chez tous les êtres vivants (à quelques détails près), les mêmes systèmes qui assurent tout d'abord la transcription puis la traduction des messages génétiques, aboutissant à la synthèse de protéines qui, chez tous les êtres vivants, sont formées à partir des mêmes vingt acides aminés principaux ; le dictionnaire des codons, des groupes de trois bases qui spécifient la mise en place des acides aminés, étant le même (à quelques rares exceptions près) chez tous les êtres vivants. C'est cette unité de structure et de fonctionnement qui permet, ayant isolé un gène d'un organisme donné, de l'incorporer au matériel génétique d'un autre organisme, qui fonde par conséquent le génie génétique.

Enfin, quand il y a reproduction sexuée, ce sont les mêmes lois qui pré-

Fig. 1 – Mise en évidence des formes différentes d'un même enzyme : la glucose-6-phosphate-deshydrogénase (G6PD) chez différents individus. Electrofocalisation sur gel de polyacrylamide en couche mince. (Cliché du Centre d'hémotypologie du CNRS à Toulouse).

□ Jean Tavlitzki est professeur à l'université de Paris VII.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

sident à la distribution et à la transmission des gènes.

Unité et diversité ont pour origine le mode de réplication dit semi-conservatif de l'ADN qui, d'une part assure la reproduction conforme du matériel héréditaire, d'autre part assure que toute modification de ce matériel sera transmise à la descendance, apparaissant comme une mutation sur laquelle joueront les processus de sélection.

La génétique, c'est donc aussi l'étude de la structure des gènes, l'étude de leur fonction et des facteurs qui interviennent pour régler leur fonctionnement.

Nous savons à présent ce qu'est l'information génétique, comment elle est transmise de génération en génération, nous savons comment cette information peut être modifiée, comment elle est déchiffrée, comment elle conditionne la structure et le fonctionnement des êtres vivants. Et l'essentiel peut être résumé sous une forme qui eut ravi Pythagore :

1.20.3.4 A — T(U) ; G — C

La mise en place d'un acide aminé donné, parmi les vingt qui composent les protéines, est sous la dépendance d'un groupe de trois bases parmi les quatre qui composent l'ADN, la spécificité étant assurée par les liaisons qui s'établissent entre les bases complémentaires Adénine (A) et Thymine (T) ou Uracile (U) et Guanine (G) et Cytosine (C).

La démarche du généticien

Pour l'étude de ces différents aspects, le généticien dispose de deux voies d'approche.

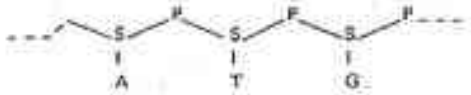
Partant de ce qu'il observe, il va s'assurer que le caractère qu'il étudie est bien héréditaire. L'étude des modalités de transmission lui permettra de savoir si le caractère en question est sous le contrôle d'un ou de plusieurs gènes. C'est le premier cas qui est le plus favorable. Il s'attachera alors à mettre à jour la modification biochimique qui détermine le caractère. L'isolement de la protéine modifiée lui donnera la possibilité d'accéder au gène responsable qu'il pourra isoler et étudier.

Un exemple permet d'illustrer cette démarche, celui de l'anémie falciforme. Ce sont d'abord des individus qui souffrent d'une anémie grave et mortelle, dont les globules rouges ont une forme particulière : en faucille. Ce caractère héréditaire est sous le contrôle d'un

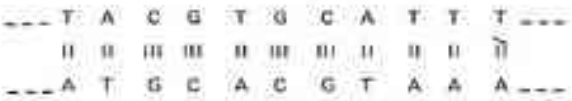
LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES CHEZ LES BACTERIES

L'acide désoxyribonucléique, ADN, constitue le matériel héréditaire de tous les organismes et de la plupart des virus. Chez certains virus, la même fonction est assurée par l'acide ribonucléique ou ARN.

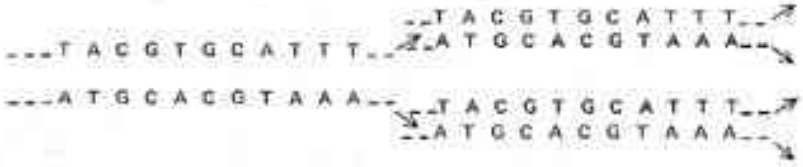
Chaque molécule d'ADN est formée par l'assemblage de bases nucléotidiques, les liaisons s'effectuant par l'intermédiaire du groupe phosphorylé, le sucre étant le désoxyribose, selon le modèle schématique suivant :



Chaque molécule est formée de deux brins enroulés en une double hélice, la structure étant stabilisée grâce aux liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène) qui s'établissent entre l'adénine et la thymine d'une part, la cytosine et la guanine d'autre part :

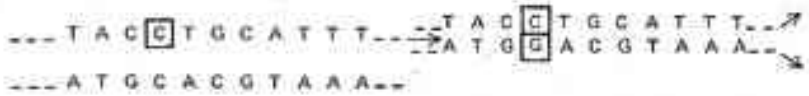


Chacun des brins est donc complémentaire de l'autre. Lorsque l'ADN est répliqué, par exemple avant la division cellulaire, chacun des brins sert de matrice pour la synthèse d'une chaîne complémentaire et par conséquent identique à l'autre :



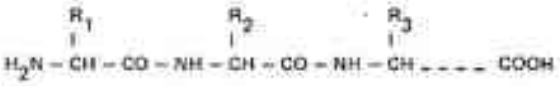
Les cellules-filles ont donc le même matériel génétique, synthétisent les mêmes protéines, ont les mêmes structures et accomplissent les mêmes réactions.

Lorsqu'une des bases se trouve modifiée, ce système de réplication semi-conservative, où interviennent plusieurs enzymes eux-mêmes spécifiés par l'ADN, assure que la modification sera transmise aux cellules-filles : il y a mutation.



Une partie du message se trouvant modifiée, la protéine régie par la séquence en cause sera différente, ce qui se répercutera au niveau de la réaction catalysée et aura pour conséquence d'imposer un caractère nouveau à la cellule et à ses descendants (chez les organismes pluricellulaires, seules les modifications atteignant les cellules germinales sont transmises aux générations suivantes).

Toute protéine est formée par l'assemblage en de longues chaînes (de cent à plusieurs centaines) de vingt acides aminés qui diffèrent par le radical R.



Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Une fois synthétisée, ou au cours de sa synthèse, chacune de ces longues chaînes se replie sur elle-même, la structure tridimensionnelle adoptée ne dépendant que de la géométrie des atomes et étant stabilisée grâce aux liaisons hydrogènes. C'est cette structure tridimensionnelle qui impose à la protéine sa fonction.

L'ordre et la nature des acides aminés mis en place sont sous la dépendance de l'ordre et de la nature des bases de l'ADN, la spécificité étant toujours assurée par la complémentarité entre les bases. Ce passage d'un alphabet à quatre lettres à un alphabet à vingt lettres fait intervenir plusieurs étapes :

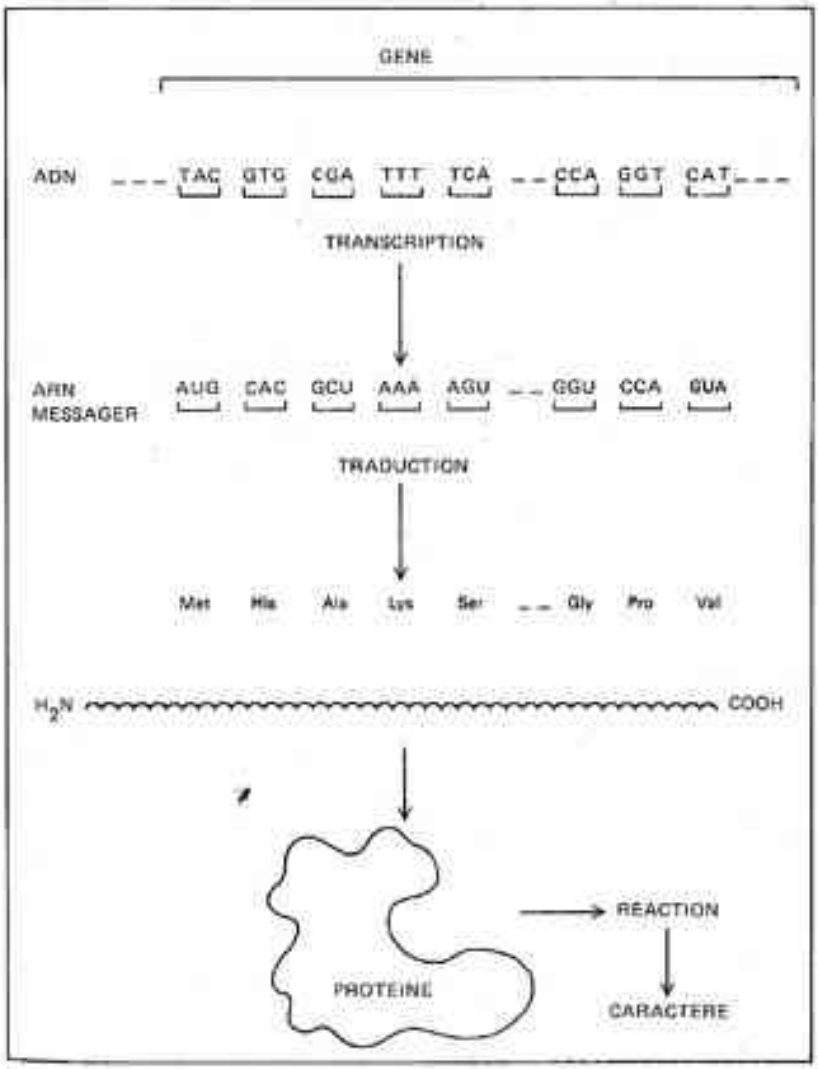
• une étape de transcription au cours de laquelle l'un des brins de l'ADN (tantôt l'un, tantôt l'autre, mais jamais les deux ensemble) sert de matrice pour la synthèse d'une chaîne complémentaire d'acide ribonucléique. Seules différences avec l'ADN : le sucre est ici le ribose et la thymine est remplacée par l'uracile. Selon la séquence de bases de l'ADN qui est transcrite, l'ARN synthétisé aura des fonctions différentes, les ARN traduits en protéines étant les ARN-messagers.

• l'étape de traduction d'un tel ARN fait intervenir de nombreux enzymes et de nombreux facteurs dont les plus importants sont :

– les ARN de transfert qui peuvent servir de « traducteurs » du fait qu'ils connaissent les deux langages, le langage nucléique et le langage protéique ; un ARN de transfert donné peut en effet se fier de façon spécifique à un acide aminé donné (réaction catalysée par un enzyme spécifique). Ce même ARN de transfert possède un groupe de trois bases (anticodon) qui sont complémentaires d'un groupe de trois bases (codon) de l'ARN-messager ;

– les ARN qui font partie intégrante des ribosomes, particules de nature ribonucléoprotéique où se fixent l'ARN-messager et les ARN de transfert liés à leurs acides aminés et où s'effectuent les liaisons entre acides aminés, les ARN de transfert étant détachés du complexe au fur et à mesure que chaque liaison s'établit.

La traduction s'effectue donc séquentiellement, chaque acide aminé étant mis en place selon l'ordre qui lui est dicté par les séquences de codons de l'ARN-messager qui dérive directement de la séquence des bases du segment de l'ADN, du gène, impliqué. Il y a 4^3 soit 64 codons possibles. Ils correspondent chacun soit à un acide aminé – des groupes de certains codons correspondant au même acide aminé – soit à des signaux de début ou de fin de lecture.



seul gène et ce sont les propriétés de l'hémoglobine (transporteur de l'oxygène) qui sont modifiées. L'analyse de la partie protéique de cette molécule révèle qu'elle diffère par un seul acide aminé de la protéine homologue des individus qui ne souffrent pas de cette affection. L'ARN-messager spécifique de la protéine (voir encadré) est isolé des cellules normales et sert de sonde pour identifier le gène en cause ainsi que le gène muté. La comparaison des séquences de bases permet de confirmer que les deux gènes diffèrent par une seule base nucléique.

Cette approche, la plus ancienne et partant la plus classique, celle de la génétique formelle, fait appel, selon le type d'organisme étudié, à deux types de méthodes. Lorsque le matériel s'y prête, et il est alors choisi en fonction de ses commodités, on recourt à la production de mutants et à différents types de croisements qui permettront de savoir si le caractère étudié est ou non sous le contrôle d'un seul gène, s'il s'agit d'un gène situé sur un chromosome – donc dans le noyau – ou s'il fait partie intégrante de l'ADN « cytoplasmique » – c'est-à-dire contenu dans les mitochondries, les chloroplastes ou d'autres structures du cytoplasme –. S'il s'agit par exemple d'un gène chromosomique, il sera possible de savoir sur quel chromosome il est situé, quelle place il y occupe par rapport à d'autres gènes qui forment le même groupe de liaison (voir p. 46), d'établir la carte génétique de ce groupe que l'on pourra faire correspondre avec la carte chromosomique en utilisant les méthodes de la cytogénétique.

Si le matériel ne se prête pas à des croisements contrôlés, comme c'est le cas pour l'espèce humaine, ce sont les méthodes statistiques d'analyse des ségrégations (voir p. 46) auxquelles on aura recours. Ces méthodes permettent là aussi de savoir si le caractère étudié est déterminé par un ou plusieurs gènes, s'il est récessif, dominant ou s'il y a co-dominance. Elles permettent également d'analyser les liaisons entre gènes et, dans certains cas plus favorables, comme celui du chromosome sexuel (X), de mettre en rapport cartes génétiques et cartes chromosomiques en mettant à profit les remaniements de structure que les chromosomes peuvent présenter.

L'analyse génétique dans l'espèce humaine bénéficie, depuis quelques années, d'une méthode nouvelle qui contribue de façon très efficace à établir la cartographie des gènes : la fusion de cellules humaines et de cellules de souris fournit des cellules hybrides qui

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

sont cultivées *in vitro* et perdent préférentiellement des chromosomes humains au cours de leurs divisions. Si la perte d'un chromosome donné s'accompagne de la perte d'un ou plusieurs caractères, c'est que ceux-ci sont déterminés par un ou des gènes situés sur ce chromosome. Là encore, les remaniements de structure des chromosomes permettent de localiser de façon précise les gènes en cause (voir p. 48).

L'utilisation de ces hybrides somatiques ne se limite pas à ce seul aspect. La réalisation de cellules hybrides homme-homme, ayant pour effet de réunir dans un même cytoplasme deux équipements chromosomiques différents, donne la possibilité de savoir si deux mutations imposant le même caractère affectent ou non le même gène : dans le premier cas, la cellule hybride sera de type mutant, dans le deuxième elle sera de type normal, la fonction déficiente de chacun des génomes étant complémentée par la fonction normale de l'autre. On peut ainsi montrer par exemple qu'une même maladie héréditaire présentant des symptômes identiques ou très voisins est en réalité sous la dépendance de mutations affectant des gènes différents. Ou, à l'inverse, que des maladies caractérisées par des symptômes différents sont en réalité le résultat de mutations différentes affectant le même gène. L'hybridation cellulaire constitue également un outil efficace pour l'étude des mécanismes qui fondent la différenciation cellulaire, comme on le verra plus loin (voir p. 40).

La deuxième voie suivie par le généticien, la plus récente, consiste à isoler des fragments d'ADN (a), à repérer ceux qui correspondent au gène qu'il veut étudier, à déterminer la séquence des bases qui les constituent (fig. 2). Le gène ainsi isolé est flanqué de ses parties adjacentes dont il est également possible de déterminer les séquences. On accède ainsi aux groupes de bases qui, situées à l'extérieur du gène, peuvent jouer le rôle de sites de reconnaissance pour les protéines de régulation qui, en s'y liant de façon réversible, contrôlent l'expression du gène. Par ailleurs, connaissant la séquence des bases, il est possible d'en déduire la séquence des acides aminés de la protéine dont la synthèse est régie par le gène, méthode rapide et sûre quand il s'agit de protéines de poids moléculaire

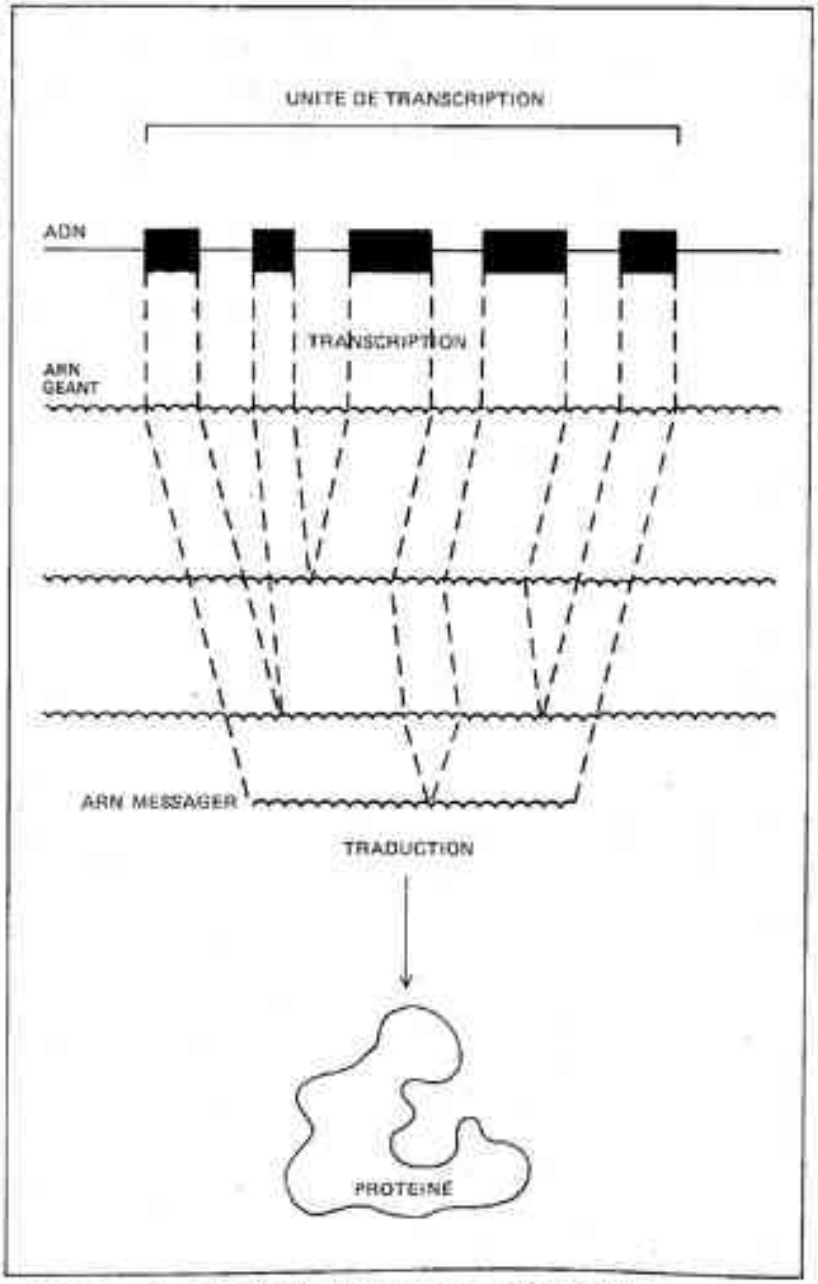
(a) La totalité de l'ADN chromosomique de la drosophile, de la souris, de l'homme ... est actuellement répartie sous forme de fragments insérés dans des vecteurs bactériens que l'on peut multiplier à volonté et à partir desquels il est possible d'obtenir chacun de ces fragments en quantité importante.

L'EXPRESSION DES GENES « MOSAIQUES »

C'est principalement l'étude des bactéries et de leur virus qui est à l'origine de notre conception des mécanismes d'expression des gènes. Les grandes étapes, transcription et traduction, s'en retrouvent chez les organismes qui possèdent un véritable noyau, distinct du cytoplasme (les organismes eucaryotes) mais les modalités selon lesquelles ces processus s'y effectuent sont différentes, particulièrement chez les organismes pluricellulaires.

Les différences portent sur plusieurs points, dont les principaux sont les suivants :

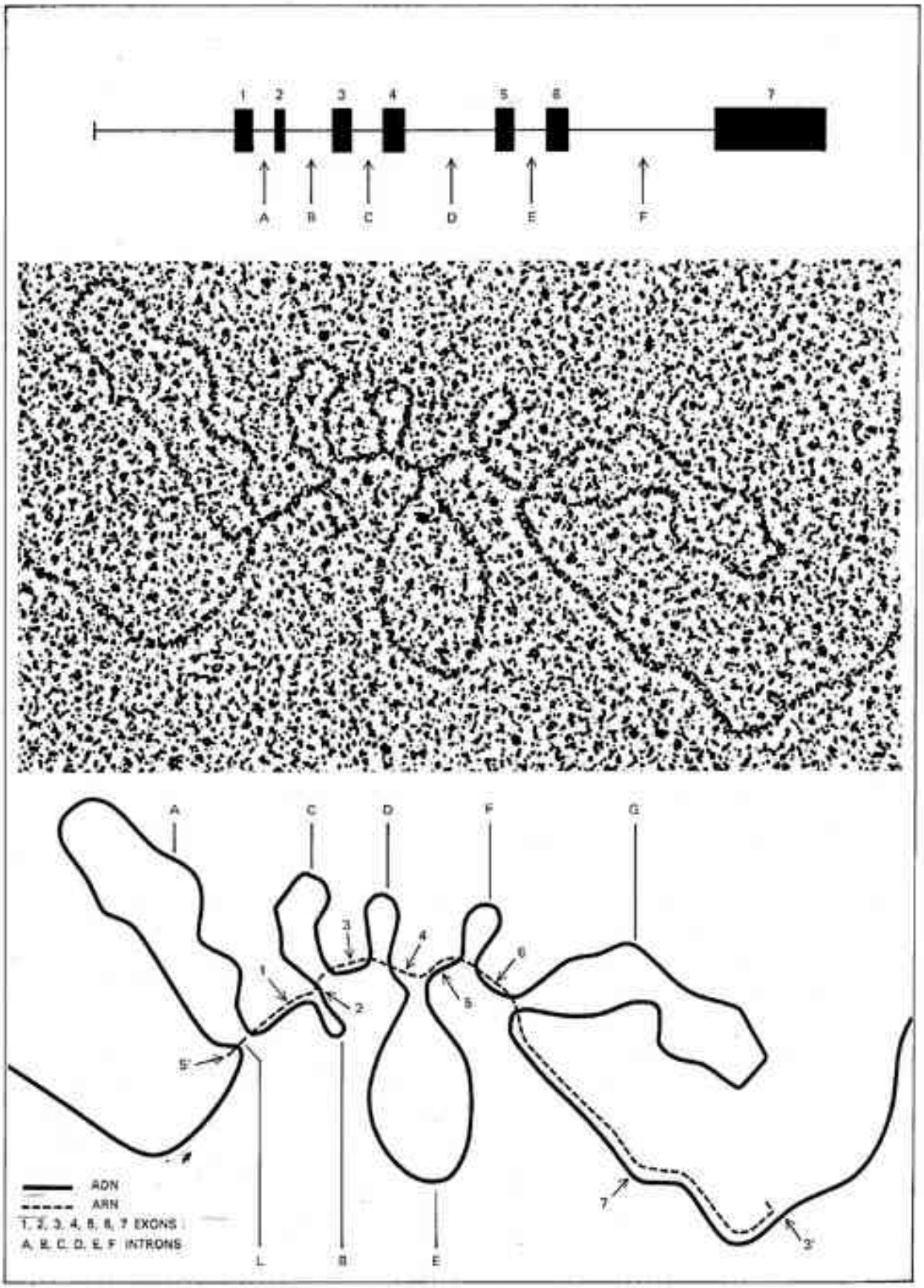
- au contraire de ce qui se passe chez les bactéries, où la traduction du message s'effectue dès que l'ARN commence à être synthétisé, chez les cellules eucaryotes le produit de la transcription n'est pas immédiatement traduit, ce qui implique une certaine stabilité des ARN-messagers ;
- le produit primaire de la transcription, qui se trouve dans le noyau, est souvent (mais pas toujours) une molécule d'ARN géante, comportant des séquences de bases qui ne seront pas traduites et qui est profondément remaniée avant d'aboutir à l'ARN-messager proprement, dit ARN « mûr », selon le schéma suivant :



L'étude de molécules d'ARN intermédiaires entre le produit initial de la transcription et l'ARN-messager, qui permet de saisir les étapes de la maturation, révèle que excisions et liaisons ne se font pas obligatoirement dans l'ordre où se situent les différentes séquences.

C'est à partir des méthodes exposées dans le texte que ces résultats ont été obtenus. Ils ont été confirmés par l'étude en microscopie électronique des hybrides moléculaires formés.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf



Mise en évidence d'intermédiaire dans la maturation de l'ARN messager de l'ovalbumine. – Ce cliché de microscopie électronique met en évidence l'hybridation entre un intermédiaire de maturation et le gène complet de l'ovalbumine. Les zones non appariées, en boucle, correspondent aux séquences qui ont été précédemment excisées. – (Pierre Chambon, Laboratoire de génétique moléculaire des eucaryotes du CNRS, Université de Strasbourg I).

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

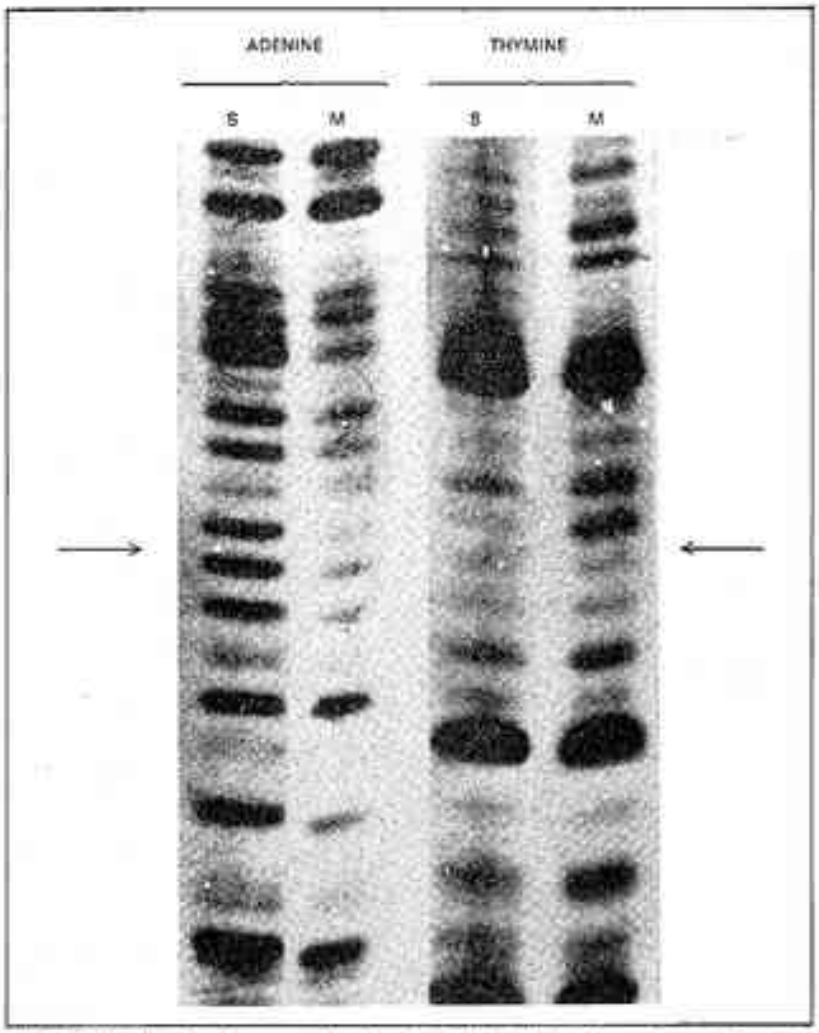


Fig. 2 – Visualisation d'une mutation dans la molécule d'acide désoxyribonucléique. Un fragment de gène mitochondrial de la levure a été cloné et la séquence de bases déterminée : la mutation résulte d'une substitution (flèche) de l'adénine chez la souche sauvage (S) par la thymine chez le mutant (M). – Cliché Centre de génétique moléculaire, Gif-sur-Yvette – CNRS.

élevé dont l'analyse conventionnelle est difficile et qui fournit parfois des résultats intéressants en ce qu'elle révèle l'existence de séquences d'acides aminés qui seront éliminées lors de la transformation de la protéine synthétisée en protéine fonctionnelle.

Cette approche peut être complétée par l'étude des produits synthétisés *in vitro*, qu'il s'agisse d'ARN ou de protéines, et bénéficie de méthodes précises et fiables :

- l'hybridation moléculaire fondée sur la complémentarité des bases A – T (U), G – C. Elle fournit des renseignements précieux tant sur la structure des génomes quand il s'agit d'hybridation entre ADN et ADN, que sur les modalités de leur expression dans le cas des hybridations ADN-ARN. La méthode d'hybridation ADN-ADN a ainsi révélé qu'au contraire de ce qui se passe chez les bactéries (procaryotes), le génome des cellules eucaryotes (qui possèdent un véritable noyau) est composite, formé de séquences semblables qui se trouvent répétées en de nombreux exemplaires et de séquences qui ne se trouvent représentées qu'une fois et dont font partie les gènes spécifiant la synthèse des protéines. Cette même méthode permet d'isoler et de purifier les différentes classes de séquences suivant leur degré de répétition. Quant aux hybridations entre ARN et ADN, elles permettent par exemple de savoir avec quelle fréquence tel type de séquence d'ADN est transcrit, de déceler les espèces d'ARN spécifiques d'un état différencié donné, d'en mesurer les quantités synthétisées, de comparer entre eux les résultats obtenus sur différents types cellulaires depuis l'œuf, quand le matériel s'y prête, jusqu'aux états différenciés terminaux. C'est enfin l'hybridation moléculaire qui permet de repérer, parmi les lignées bactériennes dans lesquelles on a inséré des fragments d'ADN d'un autre organisme, celle qui porte le gène auquel on s'intéresse, le repérage se faisant par le biais d'une sonde radioactive (ARN ou ADN complémentaire, synthétisé à partir de ce dernier) qui s'hybride de façon sélective avec l'ADN recherché ;
- la séparation des protéines, par électrophorèse en double dimension, donne la possibilité d'analyser qualitativement et quantitativement la plus grande partie sinon la totalité des protéines qui se trouvent ou qui sont synthétisées par exemple aux différents stades du développement d'un organisme donné. La sensibilité de cette technique est telle qu'elle peut révéler l'absence d'une seule protéine (parmi les milliers qu'elle contient) dans des cellules humaines mutantes ou des différences dans une seule protéine présente mais modifiée à la suite d'une mutation ;
- le génie génétique. Il y a déjà été fait allusion à diverses reprises.

Les méthodes du génie génétique

Les dimensions du génome des cellules eucaryotes sont telles – une cellule humaine contient un mètre d'ADN – que tout gène n'en constitue qu'une très faible partie, de l'ordre du millionième. D'où l'intérêt des méthodes qui permettent d'accroître de façon considérable le nombre d'exemplaires d'un gène donné, fournissant à l'expérimentateur une quantité suffisante de matériel.

Les outils qui ont rendu possible l'essor du génie génétique sont les enzymes dits de « restriction » qui ont la propriété de catalyser la scission de l'ADN au niveau de séquences spécifiques de petite taille. On peut ainsi disséquer la molécule en un nombre déterminé de fragments, variables selon l'enzyme utilisé et, par recoupements, établir la carte physique de la molécule. Par ailleurs, les fragments obtenus peuvent être insérés dans un génome différent, comme par exemple un virus capable de se multiplier dans une cellule bactérienne qui se multiplie elle aussi, ou dans un autre type cellulaire, la détection de la lignée bactérienne qui porte le gène que l'on veut étudier se faisant par hybridation moléculaire. Le gène inséré peut ensuite être détaché de son vecteur et des techniques chimiques et enzymatiques permettent d'en déterminer la séquence.

On ne citera ici que quelques-uns des résultats fournis par ce type d'approche :

- chez les bactéries et leurs virus,

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

l'ordre et la nature des acides aminés qui constituent une protéine sont déterminés par l'ordre et la nature des bases du gène correspondant qui ne présente pas de discontinuité fonctionnelle : le produit de transcription du gène (ici l'ARN-messager) n'est que peu modifié avant de servir de matrice pour la mise en place des acides aminés. La situation est toute différente chez les organismes eucaryotes chez lesquels de nombreux gènes sont formés de segments séparés les uns des autres par des séquences de bases dont on ne retrouve pas l'équivalent au niveau de l'ARN-messager mûr. Le produit primaire de la transcription est donc profondément remanié, des segments entiers s'en trouvant excisés et éliminés et d'autres réunis pour arriver au produit fini. Ces gènes sont dit « éclatés » ou « en mosaïque », formés qu'ils sont par l'alternance de parties (les exons) dont l'équivalent se retrouve dans l'ARN mûr et qui sont donc exprimées, et de parties qui ne sont pas exprimées (les introns). Il s'exerce donc à ce niveau une régulation dont les mécanismes sont actuellement à l'étude ;

• il est important dans le cas des maladies héréditaires graves et invalidantes, et pour lesquelles aucun traitement n'est actuellement connu, de pouvoir prédire si l'enfant à naître présentera ou non cette maladie de façon, si c'est le cas, à pouvoir proposer un avortement aux parents. C'est le cas par exemple, pour les anémies graves commes les thalassémies qui affectent la fonction de l'hémoglobine. Les gènes qui spécifient la synthèse des protéines constituantes de cette molécule sont isolés. Utilisés comme sondes, ils ont permis de montrer que dans certains cas les troubles avaient pour origine la perte plus ou moins grande (parfois totale) du gène correspondant (voir p. 50). L'étude de l'ADN des cellules du fœtus, au moyen des enzymes de restriction permet de savoir si l'enfant à naître souffrira ou non de la maladie. Dans le même système, les études de génétique formelle et de génétique moléculaire aboutissent à dresser de façon précise la carte des gènes impliqués, montrant en particulier que les différents types d'hémoglobine apparaissent au cours du développement selon l'ordre dans lequel ces gènes sont situés les uns par rapport aux autres, et révélant l'existence de séquences en partie homologues qui ne sont pas exprimées ;

• le gène de l'insuline humaine (substance qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme des sucres) est isolé. L'étude de sa structure révèle qu'il s'agit d'un gène éclaté. L'un des introns (qui est excisé et éliminé) sépare deux des trois bases d'un codon de la troisième base. Il est donc nécessaire qu'un mécanisme d'une extrême précision opère au niveau de la liaison des segments d'ARN-messager qui correspondent aux exons pour que la protéine fonctionnelle soit synthétisée.

De grands problèmes biologiques encore à résoudre

Nous connaissons actuellement dans leurs grandes lignes et souvent dans leurs détails, les réactions qui opèrent dans le déchiffrage du message génétique. Nous connaissons aussi pour quelques systèmes bactériens, les mécanismes qui déclenchent ou qui empêchent l'expression de certains gènes (voir p. 16). En revanche, les systèmes de régulation de l'expression des gènes des organismes eucaryotes nous sont encore en grande partie inconnus. Il s'agit là d'un problème fondamental pour notre compréhension des phénomènes de différenciation. Tout organisme pluricellulaire est en effet issu d'une seule cellule, l'œuf (chacun de nous fut un jour invisible à l'œil nu) et chacun est composé de très nombreux types cellulaires différents qui conservent leur aspect et leurs fonctions tout au long de la vie de l'organisme. Il a été montré que la très grande majorité des cellules différenciées possèdent les mêmes gènes que ceux qui se trouvent dans l'œuf dont elles proviennent. C'est donc bien au niveau de la régulation de l'expression des gènes que doivent être recherchés les mécanismes moléculaires qui fondent le développement et la différenciation.

Toutes les méthodes de la génétique formelle et de la génétique moléculaire sont actuellement mises en œuvre sur divers systèmes, dans le but d'élucider les mécanismes qui peuvent opérer à différents niveaux : transcription, transformation de l'ARN, traduction, modification des protéines synthétisées. On citera par exemple les recherches effectuées sur des mutations qui ont pour effet d'interrompre ou de perturber le développement à ses différents stades, l'étude d'organismes relativement simples, telles certaines amibes sociales qui se différencient pour ne donner que deux types de cellules différenciées, l'étude de cellules en culture. Certaines cellules en effet lorsqu'elles sont cultivées en dehors de l'organisme peuvent conserver, perdre ou acquérir des caractères différenciés qui leur sont propres. Ce matériel permet donc d'aborder l'étude des mécanismes qui sont à la base de l'expression d'un génome et de la stabilité des états différenciés. Réunissant dans un même cytoplasme deux génomes dont l'un peut provenir d'un type cellulaire, l'autre d'un autre type, les hybrides somatiques permettent de mettre en évidence des phénomènes de régulation exercés par l'un des génomes sur les fonctions de l'autre et partant d'en aborder les mécanismes sur un système simplifié par rapport à un organisme entier, en faisant appel là comme ailleurs aux méthodes de la génétique moléculaire (voir p. 44).

Il est d'autres propriétés des êtres vivants qui bénéficient de leur étude génétique. C'est par exemple la capacité qu'ils ont d'échanger des informations tant avec leur milieu qu'avec les autres êtres vivants qu'il s'agisse de leurs congénères ou d'autres. Il est clair que, dans bien des cas, ils le doivent à des systèmes dont les structures et les fonctions sont génétiquement programmées et il suffit parfois qu'un seul gène soit modifié pour que les étapes d'un comportement le soient aussi, allant parfois jusqu'à le rendre inefficace. De telles mutations permettent donc d'aborder l'étude des mécanismes moléculaires qui sous-tendent les comportements.

Génétique formelle et génétique moléculaire se sont unies pour, durant ces dernières années, nous donner de l'ADN une idée différente et vraisemblablement plus juste de sa structure et de ses fonctions. Les modèles moléculaires de cette substance nous en donnent une image figée et statique qui ne correspond pas à la réalité. En fait, l'ADN est constamment soumis à des remaniements plus ou moins profonds : des gènes passent d'un chromosome à l'autre, des segments d'ADN sont insérés dans la molécule, d'autres en sont excisés, des recombinaisons s'effectuent, des lésions sont provoquées, qui sont réparées par des enzymes dont la synthèse est elle-même sous le contrôle d'autres gènes... On a donc affaire à un système en constant renouvellement comme l'est tout être vivant dont c'est là encore une des caractéristiques fondamentales. Et cependant le système marche. Ce qui veut dire que des lois président à ce qui nous paraît pour l'instant appartenir au règne de l'aléatoire. Les succès passés et présents de la génétique, la finesse avec laquelle elle permet de disséquer le fonctionnement des êtres vivants, donnent l'assurance qu'elle pourra fournir des réponses aux questions posées dans les différents domaines qui viennent d'être évoqués.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

La génétique microbienne

La transposition de la génétique aux microorganismes a permis de jeter les fondements de la biologie moléculaire. Aujourd'hui, on n'attend plus seulement de la génétique microbienne qu'elle facilite l'étude du fonctionnement de la cellule vivante, mais également qu'elle fournisse les outils de base de ce que l'on appelle la « révolution biotechnologique ».

Maxime SCHWARTZ

Tant qu'elle s'est adressée à des organismes complexes, tels que les animaux et les plantes, la génétique est restée une science relativement abstraite. Les « gènes » étaient de mystérieux « éléments » définis comme les sites d'événements mutationnels modifiant tel ou tel caractère héréditaire. Transposée chez les microorganismes, la génétique a perdu son mystère, elle s'est concrétisée. Le gène put être décrit en termes chimiques et son rôle précis fut élucidé. Une grande date fut l'expérience réalisée en 1944 par l'américain Avery. Celui-ci démontra que le « facteur transformant », qui était capable de transférer un caractère héréditaire d'une souche de pneumocoque à une autre (Griffith, 1928), était constitué d'acide désoxyribonucléique ou ADN. C'était la première indication que l'ADN était le support de l'hérédité, le support des gènes. D'autres travaux effectués à la même époque, tant sur le champignon microscopique *Neurospora* que sur la bactérie *Escherichia coli* établirent que la fonction d'un gène était de déterminer la synthèse d'un enzyme, c'est-à-dire d'une protéine. En effet, alors que les caractères héréditaires étudiés chez les organismes multicellulaires, par exemple la couleur de l'œil ou la forme de l'aile chez la drosophile, étaient difficilement interprétables en termes biochimiques, il fut possible d'utiliser des caractères beaucoup plus simples chez les microorganismes. C'est ainsi que Beadle et Tatum, en 1941, eurent l'idée d'utiliser, comme caractère génétique, la faculté de synthétiser un composé essentiel à la croissance du microorganisme, un acide aminé par exemple. Des mutants dits « biochimiques » ne pouvaient se développer que si cet acide aminé était fourni au microorganisme, dans son milieu de culture. On constata alors que chacun de ces mutants biochimiques était dépourvu d'un enzyme particulier, intervenant dans la biosynthèse de l'acide aminé.

La nature exacte du gène, et son fonctionnement, ne furent véritablement compris qu'après 1953, lorsque Watson et Crick eurent proposé – ce n'était alors qu'une hypothèse – une structure pour l'ADN. Pour ne retenir que les concepts essentiels à notre propos, l'ADN apparaissait comme une macromolécule linéaire résultant de la polymérisation de quatre monomères, les quatre désoxyribonucléotides. L'ordre de ces nucléotides constituait le message héréditaire, écrit dans un code que l'on appela « code génétique ». Chaque gène apparut alors comme un segment d'ADN responsable de la formation d'un enzyme donné. La taille moyenne d'un gène est d'environ 1 000 nucléotides. L'ensemble du message héréditaire d'une bactérie telle qu'*Escherichia coli* comporte environ 3 000 gènes, réunis bout à bout en une énorme molécule d'ADN circulaire, qu'on appelle chromosome.

Les microorganismes : un bon matériel pour le généticien

Outre l'existence de mutants biochimiques, de nombreux facteurs ont contribué au succès de la génétique microbienne. L'un d'entre eux réside dans le fait que les bactéries sont « haploïdes », c'est-à-dire qu'elles possèdent chaque gène en un seul exemplaire, alors que les cellules animales ou végétales sont « diploïdes », voire même « polyploïdes », c'est-à-dire qu'elles possèdent chaque gène en deux ou plusieurs exemplaires. L'haploïdie permet la détection immédiate d'un événement mutationnel, alors que cet événement demeure le plus souvent « caché » dans une cellule diploïde parce que celle-ci possède encore une copie intacte du gène qui a été muté.

D'autres avantages des bactéries sont leur petitesse et leur rapidité de multiplication, qui permettent au généticien de disposer d'énormes populations. Pourvu qu'il dispose d'une méthode de sélection adéquate, il peut ainsi aisément obtenir un mutant dont la fréquence, dans la population, est inférieure à un pour un milliard. Finalement, car la génétique ne consiste pas seulement à isoler des mutants, mais également à les croiser entre eux, le généticien dispose d'une série de techniques qui permettent de réaliser des échanges de matériel génétique entre bactéries. Les plus classiques de ces techniques consistent à exploiter des phénomènes naturels. Ce sont la transformation, faculté qu'ont certaines bactéries d'absorber de l'ADN présent dans le milieu et de l'incorporer dans leur matériel génétique, la transduction, dans laquelle l'ADN est transporté d'une bactérie à l'autre par un virus (fig. 1), et la conjugaison, véritable processus sexué dans lequel le transfert d'ADN exige le contact entre cellules.

Une autre technique, utilisée depuis peu et probablement inspirée – une fois n'est pas coutume – des travaux sur les

□ Maxime Schwartz, maître de recherche au CNRS, est co-directeur du laboratoire associé au CNRS n° 270 « Interactions cellulaires et moléculaires » à l'Institut Pasteur. Ses travaux portent sur la régulation de la synthèse des protéines et les fonctions des membranes chez les bactéries.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

cellules animales, est la fusion cellulaire, réalisée entre bactéries préalablement débarrassées de la paroi qui protège leur membrane. La contribution française à l'étude des échanges génétiques chez les bactéries a été très importante. Citons notamment les travaux de F. Jacob et E. Wollmann sur la conjugaison, ainsi que ceux de P. Schaeffer sur la transformation et sur la fusion cellulaire.

L'apport de la génétique bactérienne en biologie moléculaire

L'objectif essentiel de la biologie moléculaire est d'interpréter l'ensemble des processus qui se produisent dans la cellule en terme de réactions chimiques et d'interactions entre molécules. L'étude de ces processus se fait généralement selon l'une ou l'autre de deux démarches, qui ne sont d'ailleurs pas exclusives. Dans ces deux démarches, la génétique a sa place. Selon la première, le biochimiste identifie un enzyme qui, par sa spécificité catalytique, paraît susceptible d'intervenir dans un processus donné, par exemple la synthèse d'un acide aminé, ou la réplication du matériel héréditaire. Le rôle du généticien est alors d'isoler (fig. 2) un mutant dépourvu de cet enzyme et d'examiner si, chez ce mutant, le processus considéré est interrompu. Si c'est le cas, il aura apporté la preuve que l'hypothèse du biochimiste était correcte. Selon l'autre démarche, c'est le généticien qui a l'avantage des opérations. Il isole un grand nombre de mutants chez lesquels le processus est interrompu, et détermine combien de gènes différents sont affectés par ces diverses mutations. Ces gènes doivent nécessairement coder pour des protéines qui interviennent dans le processus étudié. Le biochimiste doit alors rechercher ces protéines et déterminer quelle est leur activité enzymatique.

Le génie génétique

La biologie moléculaire bénéficie actuellement de l'apport d'un ensemble de techniques nouvelles que l'on a réuni sous le vocable de « génie génétique ». Ces techniques, qui sont issues de la génétique bactérienne, constituent en fait une prolongation de celle-ci. Les outils de base du génie génétique sont les « enzymes de restriction », extraits des bactéries, et dont la fonction biologique est de protéger ces bactéries contre le matériel génétique provenant d'espèces différentes de la leur. Ces enzymes détruisent tout ADN pénétrant dans la bactérie dès lors que cet ADN est reconnu comme « étranger ». Ce qui fait l'intérêt technique de ces enzymes est qu'ils coupent l'ADN en des points précis définis par des séquences particulières de nucléotides. Les points reconnus par les enzymes provenant de diverses bactéries sont différents, de telle sorte qu'en utilisant une batterie de tels enzymes – il en existe des dizaines sur le marché – on peut découper l'ADN, dans le tube à essais, en autant de morceaux que l'on désire. Un progrès important du génie génétique fut la mise au point, vers

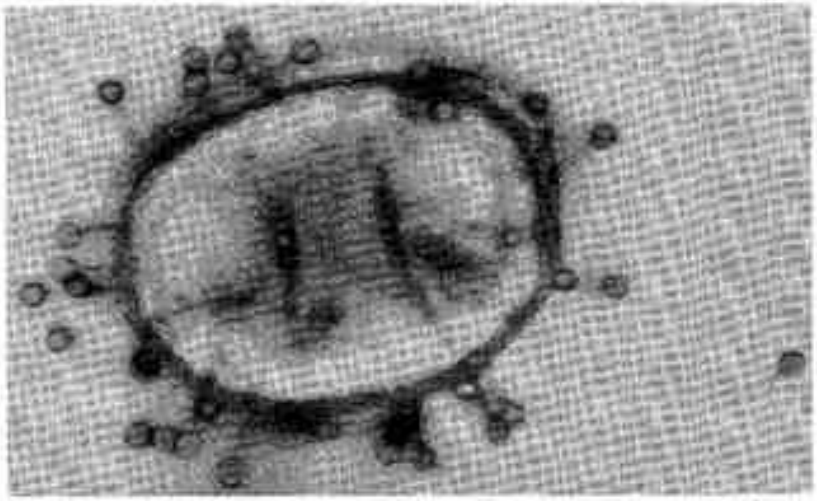


Fig. 1 – Bactérie infectée par des virus. – Les bactériophages sont des virus qui se développent dans les bactéries. On en voit ici plusieurs adsorbés à la surface d'un colibacille. Lorsqu'ils sont ainsi adsorbés, ils injectent leur ADN dans la bactérie. Une ou deux heures plus tard, la bactérie éclate, libérant de cent à mille nouveaux virus, dont la formation a été programmée par l'ADN injecté. Parmi ces nouveaux virus quelques-uns, très rares, ont par erreur emporté un fragment d'ADN bactérien, au lieu d'ADN viral. Lorsque ces rares virus s'adsorbent sur une autre bactérie, ils ne la tuent pas mais lui apportent une partie de l'information génétique de la bactérie dont ils sont issus. C'est ce que l'on appelle la transduction de l'information génétique. (Cliché de microscopie électronique. Antoinette Ryter, LA 269, Institut Pasteur).

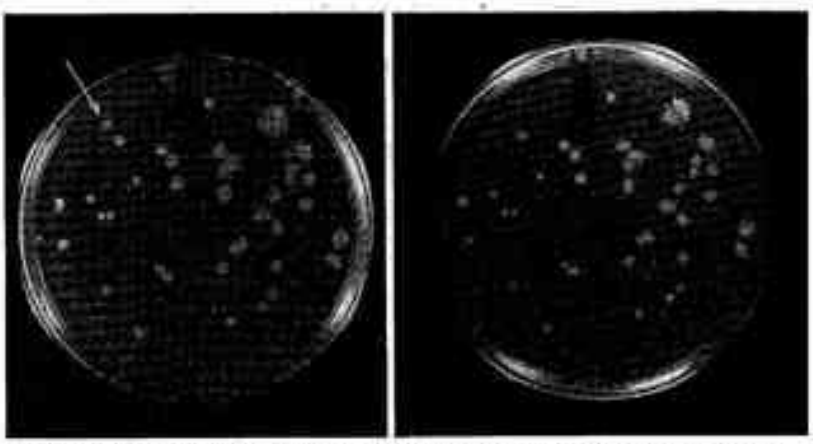
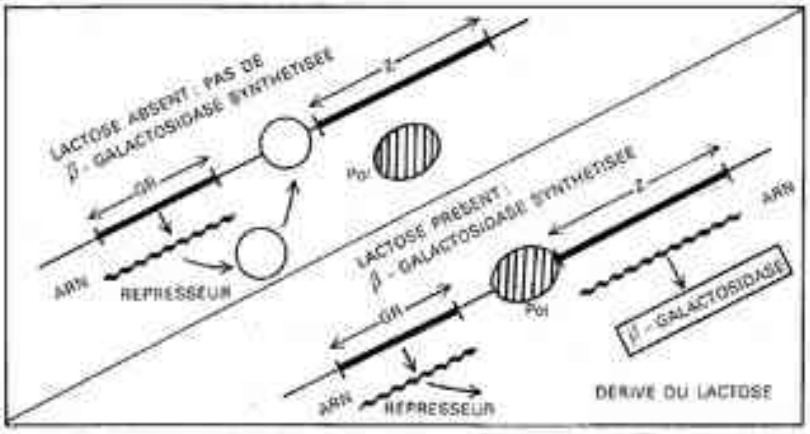


Fig. 2 – Détection d'un mutant biochimique par la technique des répliques. – Lorsqu'on étale une suspension de bactéries sur un milieu de culture (gelée nutritive), chaque bactérie déposée sur le milieu grandit, se divise et donne naissance à deux bactéries, qui se divisent à leur tour, et ainsi de suite. Après quelques heures, chaque bactérie a ainsi donné naissance à un million de descendants, lesquels forment un amas, visible à l'œil nu, et que l'on nomme colonie. La technique des répliques consiste à appliquer un morceau de velours sur un milieu recouvert de colonies, puis à mettre ensuite ce même velours en contact avec d'autres milieux. Quelques bactéries de chaque colonie se déposent ainsi sur le velours et sont ensuite transférées sur différents milieux, où elles donneront à leur tour des colonies, si ce milieu permet leur croissance. Ici, on a transféré le velours sur deux milieux, l'un (à gauche) contenant de l'histidine, qui est l'un des acides aminés intervenant dans la formation des protéines, et l'autre (à droite) n'en contenant pas. La plupart des colonies ont donné une réplique sur les deux boîtes. Les bactéries contenues dans ces colonies sont donc capables de synthétiser leur propre histidine. Cependant, quelques colonies, dont une marquée d'une flèche, n'ont donné de réplique que sur la boîte de gauche. Ce sont des mutants auxquels manque l'un des enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'histidine.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf



Une induction par « inhibition d'un inhibiteur ».

REGULATION DE LA SYNTHESE DES PROTEINES CHEZ LES BACTERIES

A – Une induction par « inhibition d'un inhibiteur »

La bactérie *Escherichia coli* ne synthétise la β-galactosidase, enzyme nécessaire à l'assimilation du lactose, que lorsque ce sucre est présent dans le milieu de culture. Elle met donc en route « à la demande » l'expression du gène qui code pour la β-galactosidase (noté Z sur le croquis). Les travaux de F. Jacob et J. Monod (1961), poursuivis par ceux de groupes américains, ont permis de comprendre le mécanisme de cette régulation.

Celle-ci fait intervenir un autre gène, dit « de régulation » (GR), qui code pour une protéine appelée répresseur. Lorsque le milieu ne contient pas de lactose, le répresseur se fixe en un point spécifique du chromosome bactérien, au voisinage immédiat du gène de la β-galactosidase. Ce faisant, il empêche la fixation de l'ARN polymérase (pol), enzyme dont la fonction est de « transcrire » l'information codée dans le gène sous la forme d'un ARN messager (m-ARN), cette transcription étant la première étape dans l'expression du gène. Le répresseur a donc pour effet de bloquer la synthèse de β-galactosidase. Lorsqu'on ajoute du lactose, un dérivé de celui-ci se combine au répresseur et le rend ainsi incapable de se fixer sur l'ADN. La voie est donc libre pour l'ARN polymérase qui peut transcrire le gène. L'induction de la synthèse de β-galactosidase résulte donc de « l'inhibition d'un inhibiteur ».

B – Une induction par « activation d'un activateur »

On sait maintenant que ce mécanisme très simple ne rend pas compte de tous les phénomènes de régulation existant dans la biosynthèse des protéines chez les bactéries. Ainsi, par exemple, nos propres travaux ont contribué à établir l'existence d'un mécanisme que l'on peut considérer comme le symétrique de celui décrit ci-dessus. Il s'agit encore de l'induction par un sucre – le maltose – de la synthèse d'un enzyme, l'amylomaltase, nécessaire à l'assimilation de celui-ci. Dans ce cas également existe un gène de régulation. Cependant le produit de ce gène est ici une protéine dite « activateur » qui, lorsqu'elle est elle-même activée par le maltose, provoque la transcription du gène codant pour l'amylomaltase. L'induction résulte donc ici de « l'activation d'un activateur ». Un tel mécanisme implique que l'ARN polymérase est incapable de transcrire le gène de l'amylomaltase, sauf lorsque l'activateur activé est présent.

Les deux mécanismes de régulation décrits ci-dessus sont différents, mais bâtis sur le même principe : le produit d'un gène régulateur (répresseur ou activateur) agit sur la transcription d'un gène de structure (celui de la β-galactosidase ou de l'amylomaltase), cette action étant modulée par la concentration d'inducteur (lactose ou maltose). Des travaux récents, provenant notamment du groupe de C. Yanofsky aux Etats-Unis, ont montré que même ce principe n'était pas universel. La régulation de nombreux gènes fait en effet intervenir un mécanisme, appelé « atténuation », que nous ne décrirons pas ici, mais qui diffère en au moins un point essentiel de ceux décrits plus haut : il ne fait pas intervenir de gène régulateur.

1976, de techniques permettant d'établir la séquence des nucléotides dans les segments d'ADN que l'on peut purifier après les avoir découpés avec des enzymes de restriction. Grâce à ces nouvelles techniques la génétique a considérablement accru son pouvoir de résolution. Elle permet de déterminer quel nucléotide a été modifié par tel ou tel événement mutationnel (encadré 2). Elle peut ainsi contribuer à l'étude des relations entre structure et fonction dans les protéines. Ceci est important, car on ignore encore presque tout du fonctionnement des protéines, ces polymères linéaires repliés en une structure tridimensionnelle bien précise et qui catalysent chacune des réactions chimiques très spécifiques. Le cas idéal est celui où la structure tridimensionnelle de la protéine a été établie par des méthodes physiques (diffraction des rayons X). Dans ce cas, on connaît la position précise de chaque portion de la protéine dans l'espace. La génétique permet alors de dire que si l'on modifie telle ou telle région, comme c'est le cas chez les mutants, on altère de telle ou telle façon l'activité enzymatique de la protéine.

La microbiologie fondamentale aujourd'hui

S'adressant aux microbes, s'adjoignant les nouvelles technologies du génie génétique, la génétique a gagné en puissance mais a un peu perdu de son individualité. Est-il généticien, est-il biochimiste celui qui localise une mutation en déterminant la séquence des nucléotides dans un fragment d'ADN ? Ceci est dit sans nostalgie. Plus que jamais, les sciences qui ont contribué à la création de la biologie moléculaire doivent conjuguer leurs efforts pour tenter de résoudre les nombreux problèmes que pose encore le fonctionnement de la cellule. Parmi ceux-ci, je ne citerai que quelques-uns, qui se rapportent aux bactéries, mais qui se posent en termes similaires pour toutes les cellules vivantes : d'abord, la régulation de l'expression des gènes, qui, depuis les travaux de F. Jacob et J. Monod, est demeurée au centre des préoccupations des biologistes moléculaires. Les mécanismes de régulation sont variés (encadré 1), beaucoup plus qu'on ne le pensait il y a dix ans, et font intervenir de multiples interactions entre protéines et acides nucléiques, interactions que l'on commence seulement à élucider. L'étude des membranes bactériennes, de leur structure, de leurs fonctions et de leur biogénèse, constitue également un vaste champ d'investigation. Les généticiens tentent d'établir des relations entre structure et fonctions dans les protéines de membranes (encadré 2) et s'intéressent aux mécanismes qui président à la distribution des protéines entre l'intérieur de la cellule et les différents compartiments membranaires. Un autre domaine de recherche, qui, contrairement aux précédents, n'est à peu près pas étudié en France, est celui des éléments transposables. Ces petits segments d'ADN, qui ont la propriété de « sauter » d'un point à l'autre du chromosome, provoquent par ailleurs des réarrangements dans le matériel génétique. Ces éléments ont des analogues chez les cellules animales et végétales et jouent probablement un rôle important dans l'évolution des espèces. Ces études sur la régulation,

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

sur les membranes, sur les éléments transposables, et sur bien d'autres aspects de la vie cellulaire, sont poursuivies dans un pur esprit de recherche fondamentale, avec pour seul but d'augmenter notre compréhension du vivant. Cependant à côté de ces travaux, se développent également des recherches sur les applications possibles de la biologie, et notamment de la génétique.

La révolution biotechnologique : un pari

En effet, depuis quelques années, on parle beaucoup de « Révolution biotechnologique ». Dans celle-ci, les applications de la génétique bactérienne devraient avoir une large part. Les microbes, dont le nom fut si longtemps associé à la seule idée de maladie, sont actuellement porteurs d'espoirs immenses. On attend d'eux qu'ils expriment à bon compte des gènes provenant d'origines diverses et codant pour des protéines ou hormones utilisables aussi bien pour l'industrie alimentaire qu'en médecine humaine ou vétérinaire. On étudie activement certaines bactéries qui savent fixer l'azote atmosphérique, dans l'espoir de transférer leurs gènes dans des plantes utiles à l'homme et de permettre ainsi à ces plantes de croître sans engrais azotés. On cherche à isoler, puis à « améliorer » d'autres espèces bactériennes, qui savent dégrader la cellulose, pour les employer à transformer les résidus agricoles en sources d'énergie (alcools ou gaz combustibles). Les microbes devront aussi fournir des vaccins, éliminer le pétrole qui pollue les plages, extraire le métal des minerais. Ces microbes seront-ils à la hauteur des espoirs que l'on met en eux ? La révolution biotechnologique sera-t-elle demain une réalité ? C'est le pari qui est fait dans la plupart des pays industrialisés. Ceux-ci devront cependant prendre garde à ne pas sacrifier la science fondamentale sur l'autel des applications. Ce serait tuer la poule aux œufs d'or.

BIBLIOGRAPHIE

F. Jacob et E.L. Wollman, *Sexuality and the genetics of bacteria* (1961). Academic Press.

Présenté par A. Lwoff et A. Ullmann, « Les origines de la biologie moléculaire. Un hommage à Jacques Monod », *Études vivantes* (1980), Paris, Montreal.

J.H. Miller and W.S. Reznikoff, *The Operon* (1978). Cold Spring Harbor Laboratory, New-York.

P. Kourilsky, « La génie génétique », *La recherche*, n° 110 (1980).

F. Gros, F. Jacob et P. Royer, *Sciences de la vie et société*. Rapport présenté à M. le Président de la République (1979). La documentation française, Paris.

M. Schwartz, « La sécrétion des protéines cellulaires », *La recherche*, 102, 742-751 (1979).

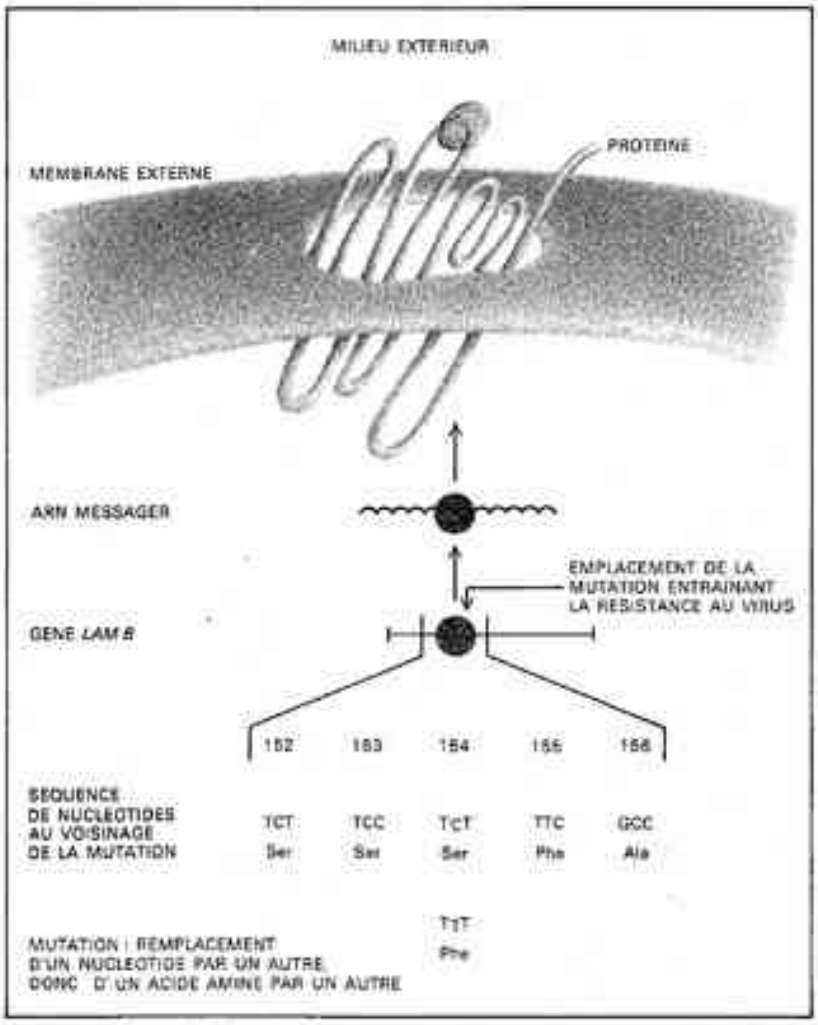
M. Rou et J.M. Clément, « Location of a phage binding region on an outer membrane protein », *FEBS Letters* 121, 127-129 (1980).

APPROCHE GENETIQUE D'UN PROBLEME TOPOLOGIQUE

Les membranes cellulaires ont des propriétés de perméabilité sélective permettant, notamment, la pénétration des molécules nécessaires à la vie cellulaire. On sait que cette perméabilité sélective est due à la présence de protéines particulières dans les membranes ; mais le mécanisme d'action de ces protéines reste en grande partie inconnu. Une connaissance précise de ce mécanisme nécessiterait que soient élucidées la structure tridimensionnelle des protéines membranaires, et la façon dont elles sont insérées dans les membranes. Nos travaux sur une protéine de la membrane externe d'*Escherichia coli* montrent comment l'approche génétique peut contribuer à l'étude de ces problèmes.

La protéine codée par un gène, dit *lam B*, intervient dans le transport d'un sucre, le maltose, à travers la membrane externe. On ignore tout sur la façon dont la protéine est repliée dans l'espace et sur les portions de cette protéine qui sont soit enfoncées dans la membrane, soit accessibles d'un côté ou de l'autre de cette membrane. Il se trouve que cette protéine sert de récepteur à un virus qui tue la bactérie, lorsqu'il l'infecte. Nous avons isolé des mutants résistant à ce virus et montré que, chez certains d'entre eux, la protéine codée par le gène *lam B* possédait, selon toute vraisemblance, une altération dans une partie de sa structure qui est normalement reconnue par le virus et qui pour cela doit être exposée à la surface de la bactérie.

En collaboration avec le groupe de M. Hofnung (Laboratoire associé au CNRS n° 271, Institut Pasteur), nous avons déterminé, par analyse de la séquence de l'ADN, quels étaient les changements de nucléotides correspondant à ces mutations. De la position du nucléotide changé dans le gène *lam B*, on déduit la position de l'acide aminé changé dans la protéine. De cette expérience, on conclut que la région de la protéine où est localisé l'acide aminé est située sur la face externe de la membrane externe.



La séquence d'une fraction du gène *lam B* est indiquée. Chaque groupe de trois nucléotides (notés A, T, G ou C) correspond à l'une des vingt espèces d'acides aminés que l'on trouve dans les protéines. Ceux-ci sont indiqués par leurs sigles habituels (Ser, Phe etc)... La mutation entraînant la résistance au virus correspond au changement de nucléotide indiqué en bas du schéma (TTT). Connaissant le code génétique, on déduit que cette mutation entraîne le changement du 154ème acide aminé de la protéine, de « Ser » en « Phe ». (Rou et Clément, 1980).

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Des gènes dans les mitochondries

Jusqu'en 1950, on ne pouvait concevoir de génétique autre que nucléaire : on pensait que toute l'information génétique devait être contenue dans les chromosomes du noyau et que sa transmission obéissait aux lois de Mendel. Grâce aux expériences sur la levure effectuées par B. Ephrussi et ses collaborateurs, on a découvert que des organites du cytoplasme, les mitochondries, contiennent elles aussi de l'information génétique. Une génétique « cytoplasmique », non mendelienne, était née, avec ses formalismes et ses mécanismes moléculaires propres.

Piotr SLONIMSKI

En 1949 paraissait aux « Annales de l'Institut Pasteur » une série d'articles de Boris Ephrussi et de ses collaborateurs. Cette série d'articles (encadré 1a ci-contre) décrivait les travaux poursuivis depuis trois années dans un des tout premiers laboratoires propres créés au CNRS, celui de génétique physiologique (fondé en 1946). Toute une branche de la biologie cellulaire et moléculaire, en plein essor actuellement (encadré 1b), est née à partir de ces travaux.

La mutation cytoplasmique « petite colonie » de la levure

Le titre général de ces publications : « L'action de l'acriflavine sur les levures » est plus descriptif qu'engageant. Il explique cependant pourquoi ces études ont été entreprises et comment B. Ephrussi pensait pouvoir les mener à bien. L'acriflavine est un colorant orange utilisé fréquemment en teinturerie. Elle a été choisie parce que des observations anciennes avaient montré qu'elle était capable également de colorer les noyaux et les chromosomes des cellules vivantes. On pouvait donc espérer modifier ces chromosomes par la fixation du colorant, produire des mutations et de ce fait aborder le problème de la nature et du mode d'action des gènes. La levure (notre bonne levure de boulangerie ou de bière – puisque c'est la même !) a été choisie parce que c'est un microorganisme eucaryote. Elle possède un noyau, des chromosomes, se divise par des mitoses et produit des cellules sexuelles par une méiose exactement comme un mammifère ou une plante. Cependant, elle se multiplie et se manipule au laboratoire comme une bactérie, très rapidement et facilement. D'où son intérêt en tant que matériel biologique pour les recherches en génétique des organismes eucaryotes. Or le choix d'un matériel adéquat pour l'étude d'un problème donné est souvent, en biologie, le facteur déterminant. Les différents articles de ce numéro en apportent la preuve. Les résultats obtenus par l'utilisation de l'acriflavine étaient à la fois conformes aux prévisions et totalement inattendus (fig. 1) : des changements, se manifestant par la formation de colonies de petite taille, héréditaires, c'est-à-dire que des mutations ont, en effet, été produites, mais :

- ces changements étaient apparemment tous identiques et affectaient 100 % des cellules (or, les mutations se produisent rarement et de façon aléatoire) ;
- la cause des changements ne résidait pas dans les chromosomes du noyau mais dans le cytoplasme de la cellule (or, d'après la théorie chromosomique de l'hérédité, les gènes sont dans le noyau) ;
- les mutations abolissaient une fonction générale de la cellule, la respiration, en bloquant la synthèse de plusieurs enzymes mitochondriaux à la fois (or, d'après la théorie un gène-un enzyme, la mutation d'un gène ne devrait toucher qu'un enzyme spécifique).

La « mutation cytoplasmique petite colonie induite par l'acriflavine » (ou « the petite » dans le vocabulaire actuel, qui a transformé l'adjectif français en un substantif anglais) a posé, au moment de sa découverte plus de problèmes qu'elle n'en a résolus. Pour résoudre ces problèmes, une autre génétique a dû se développer avec ses formalismes propres et ses mécanismes originaux. Cette génétique porte des noms variés : génétique non-mendélienne, cytoplasmique, extra-chromosomique, maternelle, mitochondriale ou chloroplastique.

Une information génétique dans deux compartiments

Chez tous les organismes eucaryotes (champignons, animaux, plantes), l'information génétique se trouve localisée dans deux compartiments cellulaires distincts : dans le noyau et, au sein du cytoplasme, dans les mitochondries (plus les chloroplastes, chez les plantes). Ces deux informations sont partiellement autonomes et partiellement interdépendantes. Portées par des molécules du même type : de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial, elles diffèrent par la nature des séquences des bases. Autrement dit, les gènes et les messages ne sont pas les mêmes.

Les molécules de l'ADN mitochondrial – qui sont circulaires – portent chacune une centaine de gènes tout au plus, alors qu'une molécule d'ADN nucléaire peut en porter jusqu'à plusieurs milliers. Elles sont par contre très nombreuses : une centaine de molécules dans une cellule de levure, des milliers dans une cellule de foie et des millions dans un ovocyte. Une bonne partie des gènes mitochondriaux code pour des éléments de la biosynthèse protéique tels que les ARN de transfert et les ARN ribosomaux. La mitochondrie a en effet, sa propre machinerie pour fa-

□ Piotr Slonimski, professeur à l'université Pierre et Marie Curie, dirige le Centre de génétique moléculaire (laboratoire propre du CNRS, associé à l'université Pierre et Marie Curie). Ses travaux portent sur la biologie moléculaire des mitochondries, ainsi que sur l'organisation, l'expression et la régulation des gènes des organismes eucaryotes.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

briquer des protéines, et une machinerie fort différente de celle du reste de la cellule eucaryote aussi bien que de celle des organismes procaryotes. A quoi sert cette machinerie ? A traduire les messages des gènes qui spécifient les enzymes clefs de la respiration et des phosphorylations qui lui sont couplées. Grâce à ces enzymes clefs, qui font partie intégrante de la membrane interne de la mitochondrie, une différence de potentiel produite des deux côtés de la membrane est transformée en des molécules d'adénosine triphosphate (ATP), monnaie d'échange de la bioénergétique. Il paraît étrange à première vue que, pour une poignée de gènes de plus, tout un système génétique distinct ait été retenu par l'évolution. Le pourquoi de cette distinction (ou plus exactement son avantage sélectif) nous échappe actuellement, le comment semble se dessiner déjà.

En effet, les gènes mitochondriaux utilisent un dictionnaire du code génétique légèrement différent du reste de la cellule. Par exemple, le codon (suite de trois bases au sein de la séquence) TGA signifie « tryptophane » dans la mitochondrie de la levure et de l'homme, tandis qu'il signifie « fin de la traduction du message » dans un gène nucléaire spécifiant l'hémoglobine. Il est même probable que des dictionnaires mitochondriaux variés ont été sélectionnés au cours de l'évolution. On conçoit aisément qu'une spéciation des « logiciels » puisse être liée à la compartimentation des « matériels » dans l'informatique de l'hérédité.

Règles formelles et mécanismes moléculaires

Les généticiens disposent de plusieurs outils : mutations, recombinaisons, tests de complémentation fonctionnelle, qui ont fait la preuve de leur efficacité pour analyser la fonction, l'organisation et l'expression des chromosomes nucléaires. Ce sont ces outils qui ont été appliqués aux chromosomes mitochondriaux. Un travail considérable a été nécessaire pour définir les différents paramètres intervenant dans la fusion et la « sexualité » des mitochondries, la recombinaison et la ségrégation des génomes mitochondriaux et pour dégager le formalisme permettant d'analyser les résultats expérimentaux. Ces études, menées essentiellement sur la levure, ont permis d'établir des règles dont la valeur prédictive est comparable à celle de la génétique classique, mais qui en diffèrent grandement. La génétique mitochondriale apparaît comme une génétique des populations intracellulaires dans

(a) « Action de l'acriflavine sur les levures », *Annales de l'Institut Pasteur* (1949) : I. B. Ephrussi, H. Hottinguer et A.M. Chimenes, « La mutation « petite colonie » », 76, 351-367. – II. B. Ephrussi, H. Hottinguer et J. Tavlitzki, « Etude génétique du mutant « petite colonie » », 76, 419-450. – III. J. Tavlitzki, « Etude de la croissance des mutants « petite colonie » », 76, 497-509. – IV. P.P. Slonimski, « Mode d'utilisation du glucose par les mutants « petite colonie » », 76, 510-531. – V. P.P. Slonimski et B. Ephrussi, « Le système des cytochromes des mutants « petite colonie » », 77, 47-64. – VI. B. Ephrussi, Ph. L'Héritier et H. Hottinguer, « Analyse quantitative de la transformation des populations », 77, 64-83. – VII. P.P. Slonimski, « Sur l'activité catalytique du cytochrome c des mutants « petite colonie » de la levure », 77, 774-776.

(b) Dix symposia ou colloques internationaux ont eu lieu au cours des cinq dernières années. Le dernier en date sur les *gènes mitochondriaux*, s'est tenu du 13 au 17 mai 1981 à Cold Spring Harbor (Etats-Unis). Dédié à la mémoire de B. Ephrussi et organisé par P. Slonimski (Gif-sur-Yvette), P. Borst (Amsterdam) et G. Attardi (Pasadena), il a réuni près de deux cents chercheurs venant d'une quinzaine de pays.

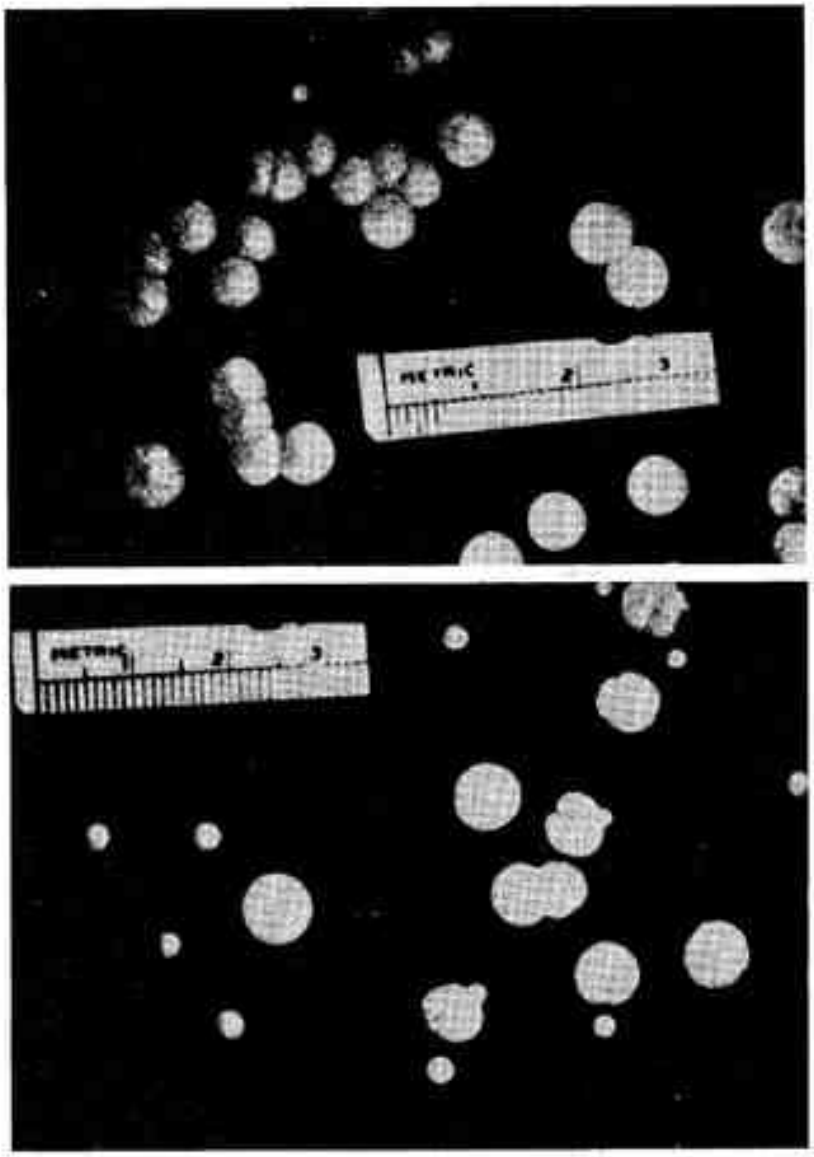


Fig. 1 – Obtention de « petites colonies ». – Lorsqu'on étale une population de levures sur un milieu gélosé nutritif, chaque cellule se trouve à l'origine d'une colonie (A). Dans un milieu nutritif contenant de l'acriflavine (B), on obtient une proportion plus élevée de colonies plus petites : les « petites ». – La levure est un micro-organisme aérobie facultatif, c'est-à-dire que le glucose peut être utilisé par la voie respiratoire et par la voie fermentaire. Les levures « petites colonies » ont perdu la capacité d'utiliser la voie respiratoire, car elles n'ont plus d'enzymes respiratoires, que contiennent normalement les mitochondries. N'utilisant plus que la voie fermentaire, les « petites », pour une même quantité de glucose consommée, forment environ quatre fois moins de cellules que les « grandes ». Les colonies formées sont donc plus petites. – Colloque international du CNRS n° 8 « Unités biologiques douées de continuité génétique » 1949. B. Ephrussi, p. 166.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

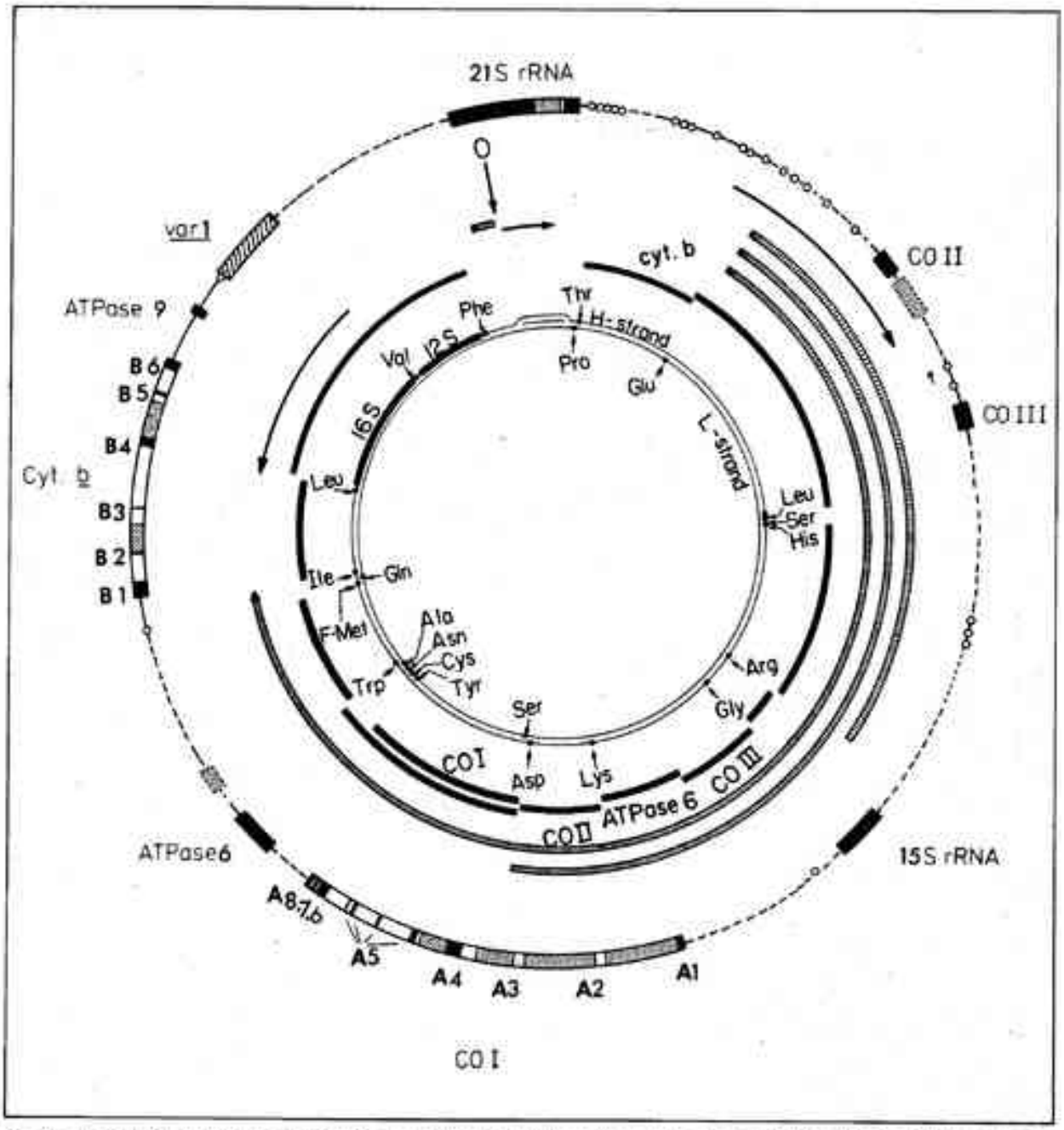


Fig. 2 – Cartographie moléculaire des chromosomes mitochondriaux : emplacement des gènes sur l'ADN circulaire de la levure (cercle extérieur) et sur l'ADN circulaire de l'homme (cercle intérieur). – Les abréviations des acides aminés (Ala, Leu...) correspondent en fait aux gènes spécifiant les ARN de transfert de ces acides aminés – r RNA : gène de l'ARN ribosomal – CO I, CO II, CO III, Cyt b, ATP ase 6 et ATP ase 9 : gènes des enzymes de la respiration et de la phosphorylation oxydative. – Certains gènes de la levure sont « mosaïques », le gène du cytochrome b (Cyt b) par exemple. – Cette figure rassemble les données présentées au symposium de Cold Spring Harbor (mai 1981).

laquelle les phénomènes d'échantillonnage, de dérive et de conversion des gènes jouent un rôle important.

Parallèlement à ces études formelles, une analyse fonctionnelle et moléculaire a été poursuivie. La levure (encore) et l'homme (enfin) ont été les matériaux de choix. La mutation « petite « colonie » a été très utile à cet égard. La levure, capable de fermenter, dispose d'une source d'énergie autre que la respiration : l'abolition totale de la respiration est donc compatible avec la vie des mutants si le milieu de culture contient des sucres fermentescibles. Or, il s'est avéré que les « petites » correspondent à de longues délétions (c'est-à-dire des pertes d'un fragment) du chromosome mitochondrial. La masse de l'ADN mitochondrial n'en est pas diminuée pour autant, car la délétion s'accompagne d'une répétition compensatoire du segment subsistant. La taille du segment délété peut être extrêmement grande, voire la totalité des soixante-quinze mille paires de bases du chromosome normal. Prenons le cas d'un mutant où 99 % du chromosome est délété : les mitochondries contiennent alors un segment d'environ sept cent cinquante paires de bases enrichi cent fois. Ainsi donc, bien avant le clonage des gènes par les techniques *in vitro*, les « petites » constituaient un moyen très efficace, utilisé encore actuellement, pour obtenir de courts fragments isolés du chromosome mitochondrial, accessibles aux analyses biochimiques et biophysiques.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Grâce à la mise en œuvre simultanée des techniques de la génétique et de la biochimie, une carte complète du chromosome mitochondrial de la levure a été établie. Les gènes y ont été placés et plusieurs milliers de mutations variées y ont été localisés (fig. 2). La séquence des bases des gènes normaux ainsi que celle de nombreux gènes mutés ont déjà été établies. Parallèlement à ces recherches, menées surtout en France, aux Etats-Unis et aux Pays-Bas, les équipes anglaises et américaines abordaient l'étude des mammifères supérieurs. Les séquences complètes de l'ADN mitochondrial de l'homme (seize mille cinq cent soixante-neuf paires de bases), de la vache (seize mille trois cent trente-huit paires de bases) et de quelques autres animaux ont été établies.

Une information génétique compacte chez l'homme, mais éclatée chez la levure

La comparaison des cartes moléculaires est très intéressante. Le chromosome humain est très compact. Les gènes y sont accolés les uns aux autres et les messages qui en dérivent sont découpés avec une précision extrême à partir d'une molécule d'ARN géante transcrite d'un seul tenant. Le chromosome de la levure, au contraire, apparaît comme « relâché ». De plus, l'organisation des deux ADN est fort différente : les mêmes gènes n'occupent pas les mêmes positions. Ces gènes sont néanmoins très semblables, car, par exemple, près de la moitié de la séquence du gène qui spécifie le cytochrome b est identique chez la levure et chez l'homme. Par contre, plusieurs gènes de la levure (celui du cytochrome b ou celui de la cytochrome oxydase, CO I) apparaissent comme beaucoup plus longs. Ceci est dû au fait que les gènes de la levure sont organisés en mosaïque ou éclatés, c'est-à-dire composés de segments successifs qui se retrouvent (appelés « exons ») ou qui ne se retrouvent pas (appelés « introns ») dans la molécule finale de l'ARN messager. En effet, on sait depuis quelques années, que les gènes nucléaires des organismes eucaryotes supérieurs sont, pour la plupart d'entre eux, organisés de cette façon. Les gènes des bactéries sont par contre continus. La découverte des gènes mosaïques dans les mitochondries de la levure a étonné, car une théorie en vogue faisait de ces organites de très vieilles bactéries qui auraient envahi, il y a des milliards d'années, nos ancêtres cellulaires pour y être domestiquées en symbiotes fort utiles. On s'attendait donc à y trouver des gènes continus. Or ils sont discontinus, alors que ceux de l'homme sont continus. De là, à déduire que les mitochondries de levure descendraient de celles de l'homme, qui elles-mêmes descendraient de la bactérie ; il n'y aurait qu'un pas ! Il est plus raisonnable de penser que l'évolution moléculaire nous réservera encore des surprises.

La raison d'être de la fragmentation de l'information génétique n'est pas apparente et le rôle des introns n'est pas encore compris. Il est probable que des facteurs multiples, tels que l'accroissement du combinatoire par l'association d'exons variés, ou l'augmentation des possibilités de régulation de l'expression d'un groupe de gènes, y contribuent.

Les gènes mosaïques de la levure se révèlent comme un des systèmes les plus intéressants pour étudier ces problèmes car de très nombreuses mutations ont pu y être obtenues, ce qui est beaucoup plus difficile chez les organismes eucaryotes supérieurs. Le fait que ces mutations arrêtent ou modifient l'expression des gènes prouve que les introns ne sont pas des séquences silencieuses dont il faut, tout simplement, se débarrasser. Dans un cas précis, celui du gène du cytochrome b, le deuxième intron code pour une protéine, la mRNA maturase, impliquée dans l'épissage du messager du gène lui-même, c'est-à-dire dans l'excision des introns et la ligature précise des extrémités des exons, tandis que le quatrième intron spécifie une autre protéine responsable de l'épissage d'un autre gène, celui de la cytochrome-oxydase. Tout un réseau de communications très complexes, dans lequel l'intron d'un gène est en réalité l'exon d'un autre, sous-tend et contrôle l'expression des gènes mosaïques. Les gènes des mitochondries, mineurs par leur nombre peuvent néanmoins nous apporter des éclaircissements sur les gènes majeurs, ceux du noyau, avec lesquels ils sont en constant dialogue.

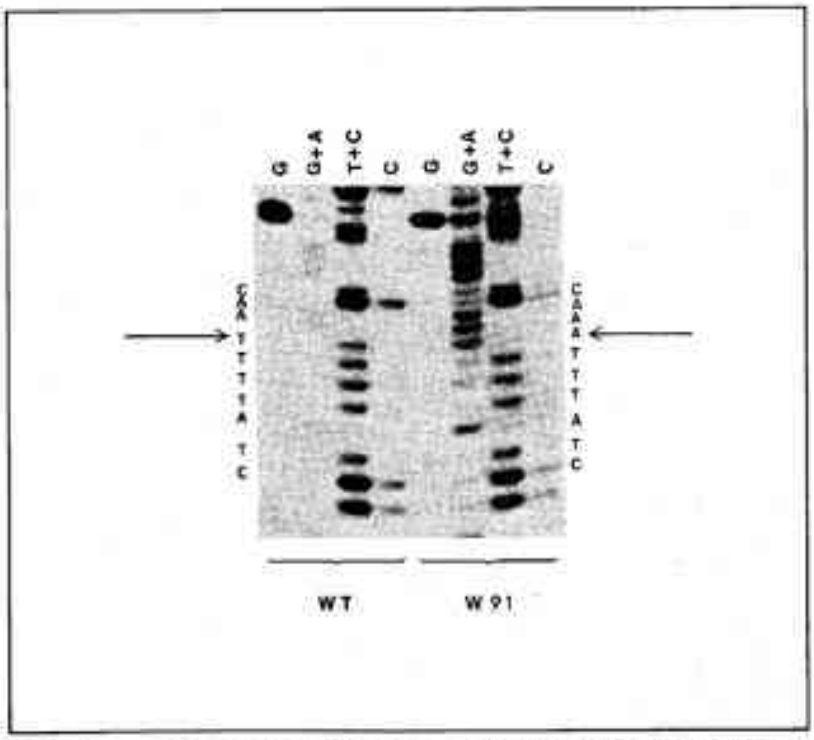


Fig. 3 – Comparaison des fragments homologues de l'ADN mitochondrial de la levure normale (WT) et d'un mutant dépourvu de la respiration cellulaire, car incapable de former un enzyme clef, le cytochrome b (mutant n° W91). Ces fragments, qui constituent 1/2 000e environ de l'ADN mitochondrial et moins d'un millionnième de l'ADN cellulaire total, ont été clonés d'abord dans une « petite » de la levure puis dans une souche bactérienne ; rendus radioactifs, leur séquence des bases a été déterminée par la technique de Maxam et Gilbert. On voit que la mutation consiste en une substitution d'une thymine (T) par une adénine (A). Cette substitution conduit à remplacer le codon TTA signifiant, dans le dictionnaire du code génétique, l'acide aminé leucine par un codon TAA ne signifiant aucun acide aminé. Il en résulte un arrêt de biosynthèse de la chaîne polypeptidique. Etant donné que la mutation W91 est localisée à l'intérieur d'un intron du gène mosaïque du cytochrome b et qu'elle empêche l'épissage correct de ses exons (voir p. 10) nécessaire pour produire l'ARN messager « mature », il est permis de conclure qu'une protéine appelée maturase, codée par l'intron, gouverne l'expression de ce gène. – La photographie a été fournie par J. Lazowska et C. Jacq. – (Centre de génétique moléculaire).

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

La drosophile, hier et aujourd'hui

La drosophile a été le matériel favori des généticiens au début du siècle. En 1935 encore, c'est sur cette mouche que B. Ephrussi et G. Beadle ont réalisé des travaux qui ont eu une grande importance dans l'élaboration du concept un gène-un enzyme. Délaissée ensuite par les chercheurs qui lui préférèrent bactéries et virus, la drosophile connaît maintenant un regain de faveur et est choisie pour les études de fonctionnement des gènes au cours du développement.

Madeleine GANS et Nicole PRUD'HOMME

La drosophile, ou mouche du vinaigre, est un insecte diptère qu'on trouve communément sur des fruits en cours de pourrissement. Un couple de drosophiles commence à fournir des descendants neuf jours après le croisement et leur nombre peut atteindre plusieurs centaines. Ces caractéristiques de multiplication rapide, jointes à la facilité de l'élevage en laboratoire, l'ont fait choisir comme matériel par les généticiens au début du siècle. La drosophile a acquis ses premières lettres de noblesse au cours de l'époque héroïque (1901-1935) où ont été établies la théorie chromosomique de l'hérédité et l'action mutagène des rayons X. Depuis, elle n'a jamais cessé d'être le matériel de choix des généticiens des populations en raison de la facilité de l'étude de populations expérimentales, grâce aux techniques d'élevage en masse mises au point par G. Teissier et Ph. L'Héritier. Dans les autres domaines de la génétique, par contre, la drosophile a vu diminuer sa vogue, vers 1940, au profit des organismes procaryotes (virus et bactéries) plus favorables à l'étude des problèmes qui se posaient alors : ceux concernant le rôle fonctionnel des gènes.

Depuis une dizaine d'années, la drosophile a opéré une remontée spectaculaire et de nombreux laboratoires ont abandonné les microorganismes procaryotes en sa faveur. Nous tenterons d'en expliquer les raisons. Auparavant, nous rappellerons les travaux sur la pigmentation des yeux de la drosophile réalisés en France par B. Ephrussi, en collaboration avec S. Chevais et G. Beadle, entre 1935 et 1939. Ils constituent en effet une étape importante dans la compréhension du rôle des gènes dans l'élaboration des caractères.

□ Madeleine Gans, directeur-adjoint du Centre de génétique moléculaire du CNRS à Gif-sur-Yvette et Nicole Prud'homme, professeur à l'université de Paris VI, étudient au CGM divers aspects de la génétique de la drosophile.

Gènes et pigments des yeux

Les drosophiles de référence, dites de type « sauvage » parce qu'elles sont issues de la nature, ont des yeux rouge sombre. Cette couleur est due à deux pigments rouge et brun. De nombreux gènes dispersés le long des chromosomes interviennent dans leur production. Considérons le pigment brun. Des mouches, dont par exemple les gènes vermilion ou cinnabar ou scarlet (1) sont sous une forme mutante (symbolisée par v, cn ou st), en sont dépourvues et, de ce fait, ont des yeux rouge vif. L'existence de la forme normale, fonctionnelle (v^+, cn^+, st^+) de tous ces gènes est nécessaire à la production du pigment brun. B. Ephrussi a pensé qu'un moyen de savoir comment les gènes agissent sur les caractères serait de trouver d'éventuels intermédiaires entre ces gènes et le pigment. L'existence de tels intermédiaires était suggérée par une observation ancienne de Sturtevant en 1920 : à la suite de la perte accidentelle d'un chromosome, de très rares mouches avaient un œil formé de cellules contenant le gène v^+ et l'autre œil formé de cellules ne contenant que la forme mutante v, or ce dernier avait une couleur rouge sombre ; il était donc capable de produire le pigment brun, malgré l'absence du gène actif v^+. On pouvait penser qu'un produit diffusible transitait des territoires v^+ de la mouche aux territoires v.

(1) La terminologie de ces trois mots est anglaise.

En 1935, B. Ephrussi trouvait une technique très efficace pour révéler l'existence de ces substances diffusibles. Il existe dans les larves de drosophile de petits amas de cellules indifférenciées qui sont les ébauches des futurs organes de la mouche adulte (ou « imago ») ; ce sont les « disques imaginaux » que l'on peut facilement distinguer les uns des autres par leur forme et leur position. B. Ephrussi a imaginé d'extraire par microchirurgie des disques d'œil, puis de les injecter dans d'autres larves. Il a obtenu, après la métamorphose, des mouches adultes renfermant dans l'abdomen, et sans connection directe avec les tissus de l'hôte, un œil parfaitement différencié. Des transplantations de disques provenant de drosophiles mutantes vermilion, dans des larves hôtes de type sauvage lui permirent de confirmer les observations de Sturtevant : la production de pigment brun par les yeux « génétiquement vermilion » implantés dans des larves sauvages. Le même résultat était obtenu en utilisant des disques provenant d'un autre mutant, cinnabar. Dans les deux cas, l'hôte sauvage fournit donc à l'œil mutant implanté une substance diffusible qui lui permet de produire le pigment brun. Mais s'agit-il de la même substance ? La réponse fut obtenue en examinant les résultats de la transplantation de disques vermilion dans des hôtes cinnabar : l'œil « génétiquement vermilion » implanté fabrique le pigment brun. L'hôte cinnabar doit donc produire et fournir à cet implant vermilion, une substance qui permet à l'implant mais pas à l'hôte cinnabar de fabriquer le pigment, c'est la « substance v^+ ». La substance diffusible produite par un hôte sauvage qui est

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

capable de restaurer la synthèse du pigment dans un œil implanté « génétiquement cinnabar », ne peut donc être la substance v⁺ ; c'est une substance différente que l'on appelle « substance cn⁺ ». Quant à la transplantation de disques oculaires cinnabar dans un hôte vermilion, elle n'entraîne aucune synthèse de pigment brun dans l'œil implanté : l'hôte vermilion déficient en substance v⁺ l'est aussi en substance cn⁺. D'autres expériences, fondées sur l'analyse de l'influence de l'implant sur l'hôte, ont permis de montrer qu'un œil « génétiquement vermilion » est capable de fabriquer la substance cn⁺ si on lui fournit de la substance v⁺.

Nous n'entrerons pas plus avant dans le détail des résultats qui ont permis à B. Ephrussi et G. Beadle de conclure que le pigment brun est formé à la suite de réactions comportant au moins deux étapes, l'une produisant la substance v⁺ contrôlée par le gène vermilion, l'autre produisant la substance cn⁺ contrôlée par le gène cinnabar.

$$\text{gène v} \longrightarrow \text{substance v} \xrightarrow{+\ \text{gène cn}^+} \text{substance cn}^+ \longrightarrow \text{pigment brun}$$

B. Ephrussi, en collaboration avec Khouvine, montra ensuite que les substances cn⁺ et v⁺, devaient être des dérivés du tryptophane, mais leurs études étant interrompues par la guerre, ce sont d'autres laboratoires qui identifièrent de façon précise les deux précurseurs. Il est certain que les travaux réalisés en France sur la drosophile par B. Ephrussi et G. Beadle, ont eu conceptuellement une grande importance dans l'élaboration de la théorie un gène – un enzyme, formulée ultérieurement par G. Beadle et Tatum à la suite de travaux portant sur des microorganismes.

Il est de fait qu'à partir de 1940 environ, c'est en utilisant des êtres plus simples que la drosophile (virus, bactéries, champignons) qu'ont été élucidés la nature chimique des gènes, leur rôle dans le métabolisme cellulaire, le code génétique, les systèmes de régulation des gènes bactériens, etc. Cet ensemble de connaissances a fourni le tremplin nécessaire à l'attaque des problèmes beaucoup plus complexes que posent l'organisation du matériel génétique des organismes supérieurs et le fonctionnement de celui-ci au cours du développement. La drosophile est apparue alors à beaucoup de chercheurs comme un matériel particulièrement favorable pour les aborder. Ce sont les raisons de ce choix que nous tenterons d'expliquer. L'une d'elles, sans doute triviale mais très importante, est que la drosophile a été étudiée depuis fort longtemps par de nombreux généticiens. De ce fait, le nombre de gènes identifiés et cartographiés est considérable et les souches mutantes se comptent par milliers. Donc, non seulement on a des chances de trouver dans cette collection le mutant adéquat pour le travail entrepris (certains des gènes jouant un rôle dans le développement, étudiés actuellement dans plusieurs laboratoires, avaient été iden-

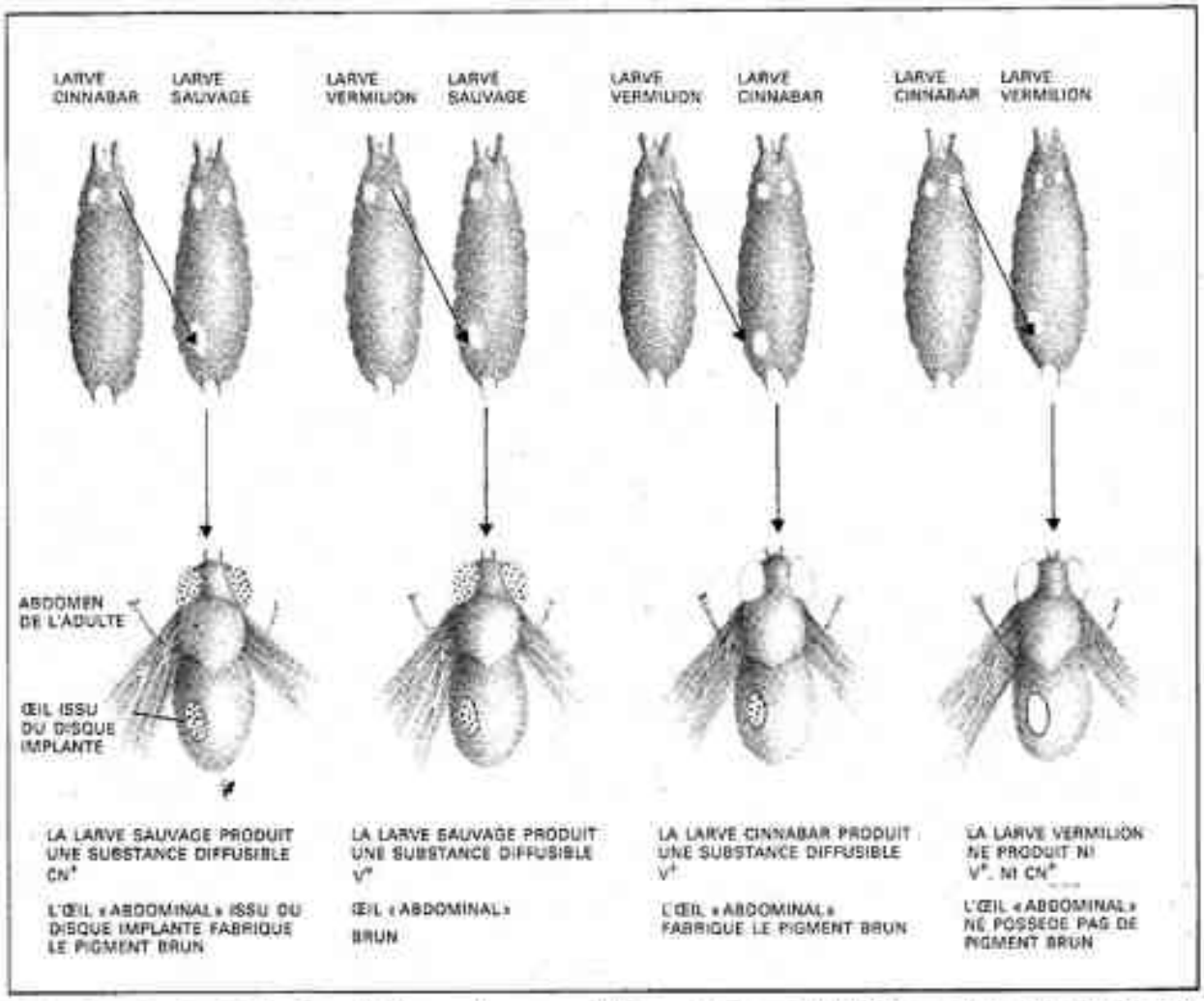


Fig. 1 – Transplantation d'« ébauches » d'œil dans une larve ne possédant pas le même matériel génétique que le transplant. (B. Ephrussi, S. Chevais, G. Beadle).

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

tifiés il y a de longues années), mais encore, par un effet de boule de neige, plus on dispose de mutants, plus il est aisé d'en identifier de nouveaux.

Les chromosomes géants

Une autre raison de ce choix est l'existence chez la drosophile, comme chez d'autres insectes diptères d'ailleurs, de chromosomes géants dans certains tissus (en particulier dans les glandes salivaires de larves). Ces chromosomes, dont la taille atteint 0,5 mm, apparaissent formés d'une succession de bandes et d'interbandes de dimensions variées et définies. Leur morphologie a été décrite avec une très grande précision (cent fois supérieure à celle des chromosomes humains) ; l'identification de remaniements chromosomiques y est simple et précise. De ce fait s'est constituée, au fil des ans, une collection considérable de souches pourvues des remaniements chromosomiques variés (inversions, délétions, translocations... Grâce à ces remaniements, on peut réaliser des opérations génétiques très sophistiquées, difficiles à réaliser chez un autre organisme supérieur. C'est en les utilisant qu'on a pu, par exemple, effectuer une exploration complète des gènes situés dans un segment chromosomique court et défini. De telles expériences ont notamment montré qu'une « bande » de chromosome correspond approximativement à un gène, bien qu'en moyenne elle contienne une quantité d'ADN trente fois supérieure à ce gène, ce qui pose le problème du rôle éventuel de ce surplus d'ADN.

Un deuxième intérêt de ces chromosomes géants est que l'on peut visualiser des zones actives : elles sont « gonflées » : c'est ce qu'on appelle un « puff ». Il est possible d'analyser avec précision la répartition des puffs, selon les tissus et selon le stade du développement, ainsi que l'effet de divers facteurs sur la mise en activité des gènes comme par exemple, celui des hormones ou d'un choc thermique (fig. 3).

Depuis le développement récent des techniques du génie génétique, de nouvelles applications sont apparues. L'hybridation *in situ* d'abord : des gènes clonés dans une bactérie et radioactifs, sont utilisés comme sonde ; ils s'apparient avec la portion d'ADN du chromosome de séquence complémentaire ; on repère ainsi l'emplacement du gène sur le chromosome (voir p. 50). Cette technique a un pouvoir résolutif sur les chromosomes géants, cent fois supérieur à celui que l'on obtient pour les chromosomes humains.

Enfin, très récemment, on a pu obtenir à partir de ces chromosomes géants la constitution de banques de gènes (voir p. 10) de drosophile, en utilisant non pas comme d'ordinaire l'ADN de l'ensemble des chromosomes, mais l'ADN de segments chromosomiques définis. En effet, grâce à la taille et la morphologie bien connue des chromosomes géants, on arrive à repérer une région courte et définie des chromosomes, à la disséquer et à l'isoler au micromanipulateur, puis à cloner l'ADN qu'elle contient dans des bactéries. Cette technique est fort prometteuse, car le problème épineux dans l'exploitation des banques de gènes d'un organisme est l'identification des rares souches contenant un gène défini, au sein des dizaines de milliers de souches bactériennes correspondant à une banque constituée à partir de la totalité des chromosomes.

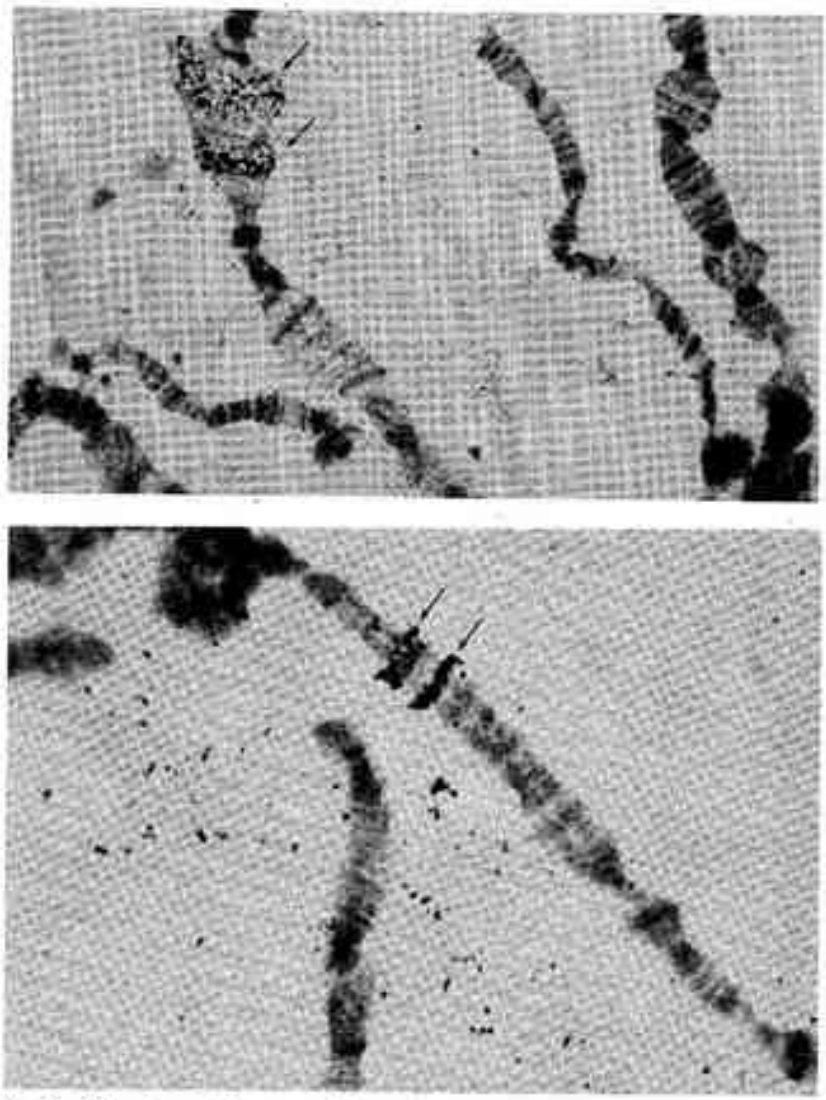
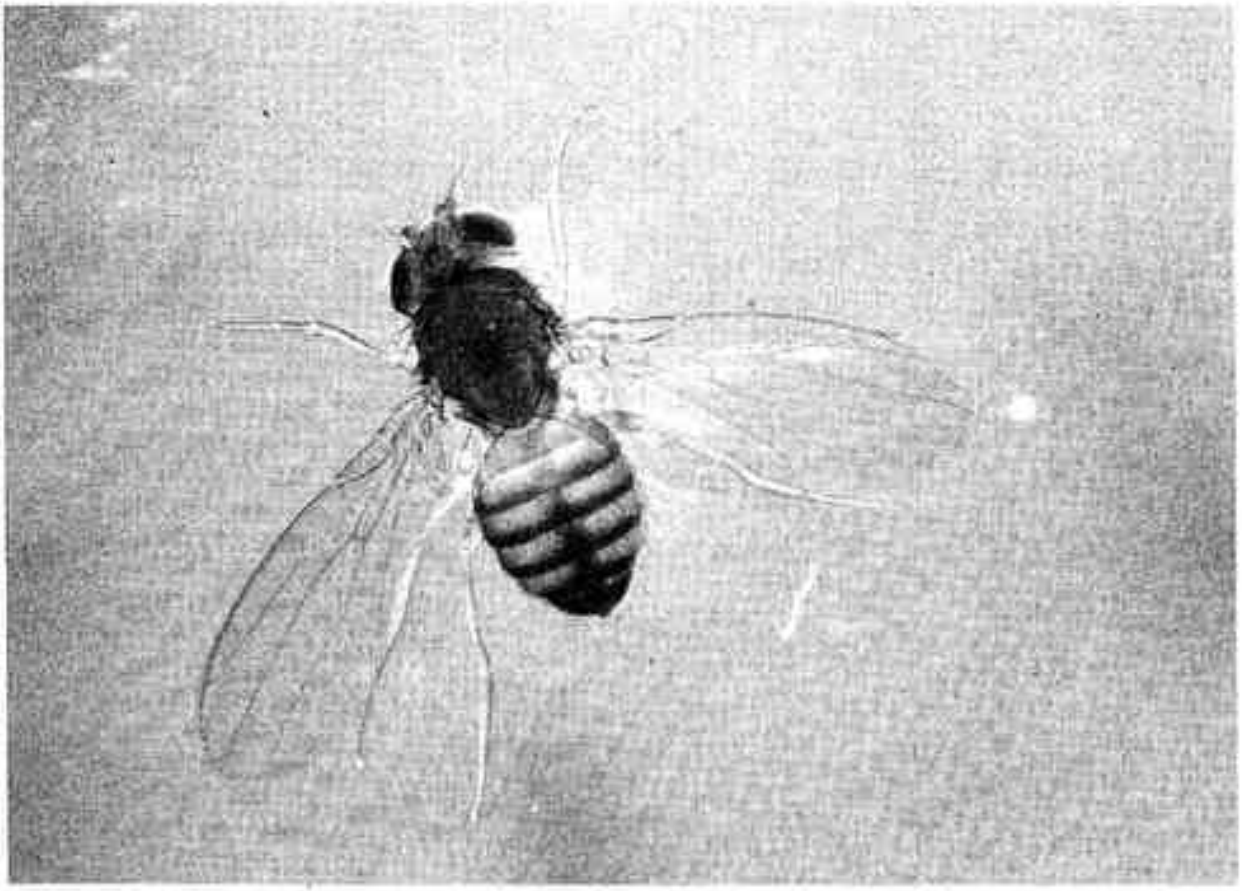


Fig. 2 – Si des drosophiles sont traitées par des chocs thermiques, les synthèses protéiques en cours cessent complètement et de nouvelles protéines dont le rôle reste à élucider sont synthétisées. Un fragment d'ADN codant pour une telle protéine a été cloné dans une souche bactérienne et cet ADN rendu radioactif a été hybridé *in situ* sur des chromosomes géants de glandes salivaires. – La photo du haut représente une petite partie de chromosomes de glandes salivaires prélevées sur des larves ayant subi un choc thermique. Le marquage, correspondant à l'hybridation *in situ* de l'ADN cloné avec l'ADN du chromosome, est localisé dans deux bandes gonflées. Le gonflement du chromosome est témoin de l'activité de transcription de l'ADN à ce niveau. – La photo du bas représente la même partie du chromosome de glandes salivaires issues de larves n'ayant pas subi le traitement thermique. Le marquage se localise sur les mêmes bandes qui, cette fois-ci, ne sont pas gonflées. Il faut noter que cette expérience montre qu'une même séquence d'ADN (celle qui a été clonée) et qui code pour une seule protéine, se trouve répétée au moins deux fois dans le chromosome (dans les deux bandes marquées). – Cliché prêté par M. W. Gehring.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf



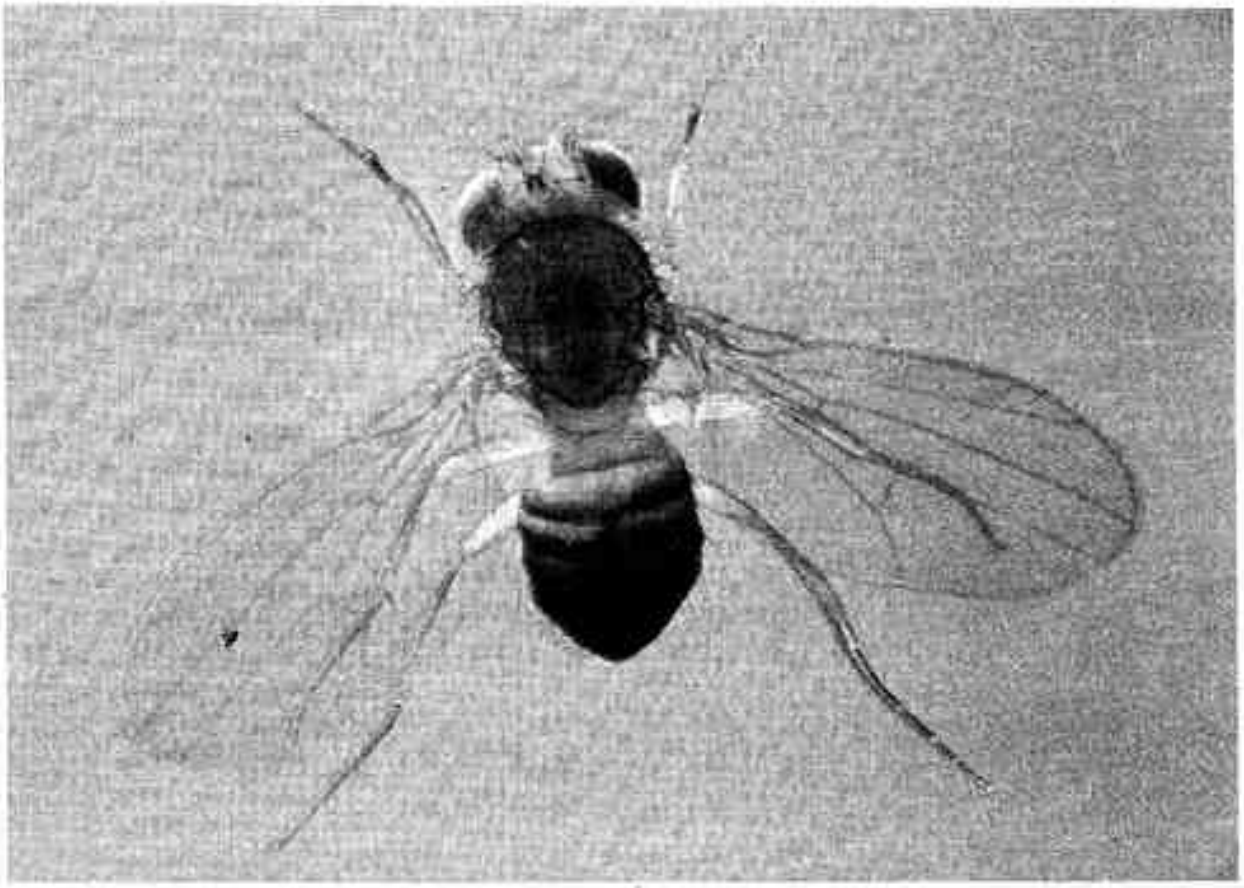


Fig. 3 – Femelle et mâle drosophiles de type sauvage.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

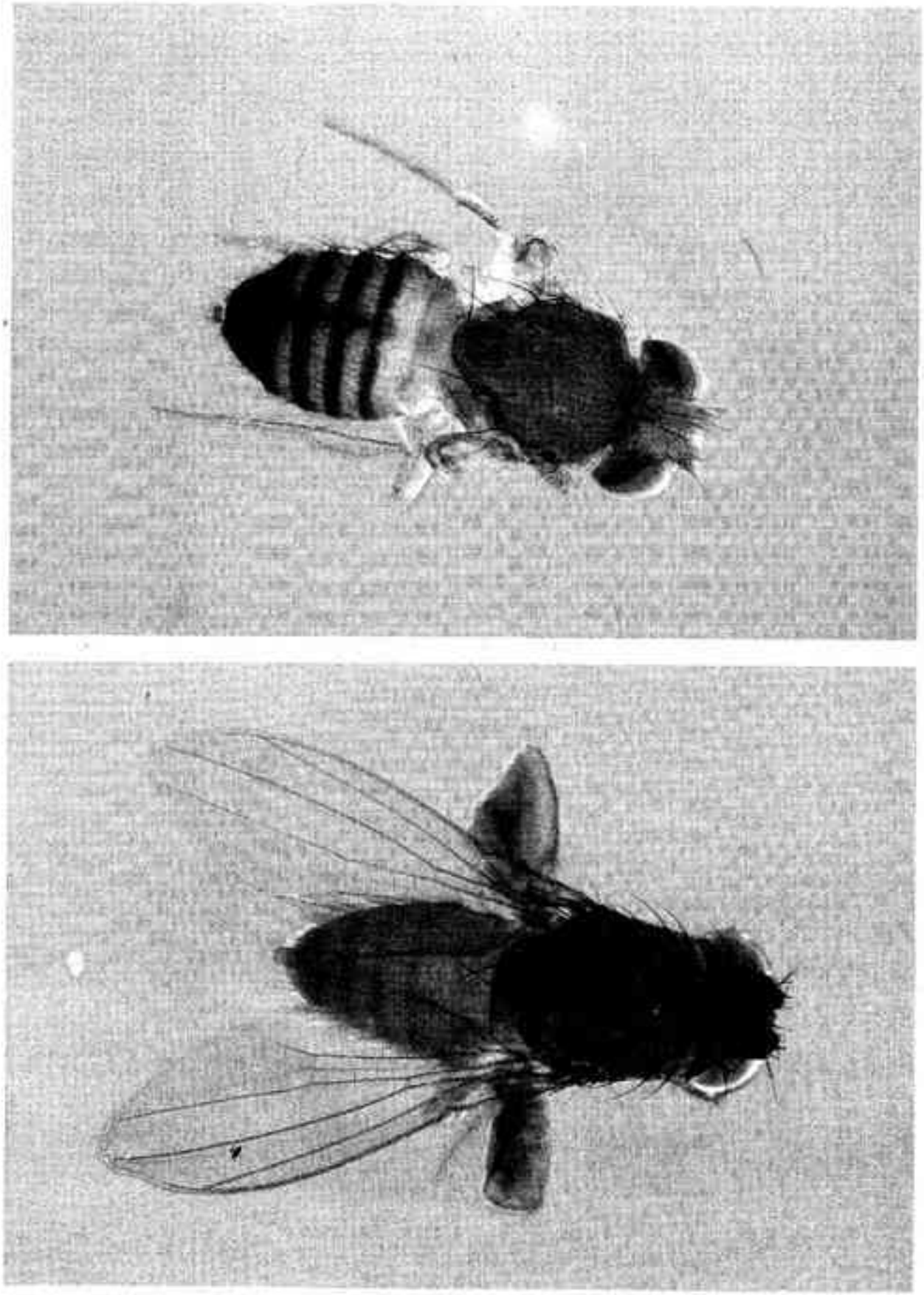


Fig. 4 – Mutants dits « de développement » : a) transformation des ailes en balanciers ; b) transformation des balanciers en ailes. – En haut : la mutation conduit à la transformation d'ailes en balancier : la mouche possède quatre balanciers. – En bas : la mutation conduit à la transformation de balanciers en ailes : la mouche possède quatre ailes.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Etant donné la précision de l'hybridation *in situ* et la possibilité de constituer des banques de gènes à partir de fragments de chromosomes, il n'est pas illusoire de penser que n'importe quel gène de la drosophile sera susceptible d'être isolé dans un avenir proche.

Les mouches « mosaïques »

En ce qui concerne l'étude du développement, la drosophile s'avère être un remarquable organisme. Bien sûr, l'une des raisons en est que de nombreux gènes intervenant dans le développement ont pu être repérés grâce à l'effet de leur mutation : par exemple, on sait que dans une courte région du chromosome 3, la région « bithorax », sont groupés des gènes dont les mutations conduisent à la substitution d'un organe par un autre : par exemple des ailes sont formées à la place des balanciers, ce qui fait que la mouche possède quatre ailes, ou inversement des balanciers sont formés à la place des ailes (fig. 4). Analysée jusqu'ici uniquement par les procédés classiques de la génétique, la région bithorax peut maintenant l'être par les procédés du génie génétique, l'ADN qui la forme ayant été récemment isolé.

Mais la drosophile est favorable à l'étude du développement pour une autre raison. Il est possible de modifier l'information génétique d'une cellule somatique en induisant des pertes de chromosomes ou des crossing-over somatiques (2), le crossing-over permettant d'induire la modification à un stade quelconque et précis du développement. Prenons un exemple. Le gène « forked » intervient dans la morphologie des soies qui sont présentes sur pratiquement toute la surface de la mouche : lorsque la forme mutante du gène « f » est seule présente (f/f), les soies sont courtes et frisées, alors que les mouches possédant la forme normale du gène (f^+/f^+ ou f^+/f) ont des soies longues et droites. Au sein d'un embryon f^+/f, un crossing-over somatique peut conduire à la formation d'une cellule f/f. Il s'ensuivra un adulte « mosaïque » constitué de cellules f/f dérivant de celle-ci et de cellules contenant la forme normale f^+. Comme, contrairement à ce que l'on a vu avec la pigmentation de l'œil, il n'y a pas, pour le gène « forked », de produits diffusibles qui puissent corriger l'effet de la mutation, la présence de soies courtes et frisées permettra d'identifier les territoires de l'adulte dérivant de l'unique cellule embryonnaire f/f, produite par le crossing-over. Si ces territoires par exemple, s'étendent d'une patte à une aile, on pourra conclure que la cellule initiale conservait, au stade où le crossing-over a été induit, la potentialité de donner ces deux organes.

Mais on peut encore aller plus loin dans ce type d'expériences. Imaginons que le crossing-over ait été induit dans un embryon l^+/l – l est un gène mutant qui, en l'absence de la forme normale l^+, cause la mort des cellules si celles-ci sont maintenues à 29°C, mais non à 20°C (mutant « thermo-sensible ») –. A la suite du crossing-over, sera produite une cellule l/l qui, si la température d'élevage est maintenue à 20°C, va se multiplier. Mais si au bout d'un certain temps, on porte la température à 29°C, toutes les cellules l/l mourront. On arrive ainsi à supprimer un ensemble de cellules, ayant la particularité de dériver toutes d'une cellule unique, au stade du développement où est intervenu le crossing-over. C'est grâce à ces mouches « mosaïques » qu'ont été obtenus, au cours des dernières années, de nombreux renseignements concernant la capacité de régénération des cellules, l'établissement au cours de la morphogénèse précoce de territoires cellulaires qui évolueront en structures définies chez l'adulte, le moment d'action des gènes intervenant dans le développement, etc...

Il est important de souligner que c'est l'existence simultanée chez un même organisme des particularités précédemment exposées (nombreux mutants disponibles, chromosomes géants, crossing-over mitotiques) qui confère à la drosophile tout son intérêt. Les crossing-over mitotiques ne pourraient être efficacement exploités si l'on ne disposait de mutants nombreux et variés. L'analyse génétique classique seule ne permet pas l'étude directe, au niveau moléculaire, des produits primaires des gènes, accessibles au contraire par les techniques du génie génétique. Inversement, la fonction d'une séquence d'ADN cloné peut difficilement être définie si l'on ne dispose de mutants permettant d'observer les conséquences de sa modification.

Nous n'avons fait ici qu'un exposé partiel des possibilités offertes par la drosophile. Les cultures *in vitro* de cellules diploïdes, voire haploïdes, la culture des disques imaginaux chez des adultes, les nombreuses interventions chirurgicales réalisables telles que la transplantation de noyaux, la ligature d'embryon etc., sont également d'un grand intérêt bien qu'elles ne soient pas détaillées ici.

(2) Il peut arriver qu'accidentellement deux chromosomes homologues s'appariant dans des cellules somatiques et qu'ils échangent alors des parties de chromosomes. La fréquence de ce phénomène peut être accrue par l'utilisation de radiations.

LES RECHERCHES SUR LA DROSOPHILE AU CNRS

Institut de recherche en biologie moléculaire (CNRS, université de Paris VII) = contrôle hormonal de l'expression des gènes – instabilités du matériel génétique.

Laboratoire de génétique moléculaire des eucaryotes (CNRS – U 184 de l'INSERM, Strasbourg) = récepteurs hormonaux ; gènes intervenant dans la détermination du mésoderme et de l'ectoderme.

Laboratoire de génétique et biologie cellulaire (CNRS, Marseille) = expression des gènes au cours du développement.

Centre de génétique moléculaire (CNRS, Gif-sur-Yvette) = régulation des gènes codant pour les ARN ribosomaux – contrôle génétique et hormonal de l'ovogénèse et des premiers stades du développement – systèmes de communication chimique dans le comportement sexuel et leur modulation.

Laboratoire de biologie et génétique évolutives (CNRS, Gif-sur-Yvette) = génétique des populations naturelles, stratégie adaptative, biologie évolutive, coévolution et spéciation.

Laboratoire de génétique des virus (CNRS, Gif-sur-Yvette) = étude des gènes de la drosophile intervenant dans la multiplication de rhabdovirus au cours de l'infection.

Centre de morphologie expérimentale (CNRS, université de Bordeaux I) = analyse des hormones au cours du développement embryonnaire.

Endocrinologie des arthropodes (ER 229, Gif-sur-Yvette) = contrôle de la différenciation par l'hormone de mue.

Laboratoire de pathologie comparée (LA 43, St Christol-les-Alès) = virus de la drosophile.

Génétique physiologique (LA 86, université de Paris XI) = mutagénèse et éléments transposables.

Physiologie et génétique des insectes (LA 243, université de Lyon I) = génétique des populations, mécanisme assurant la variété, l'adaptation et le pouvoir évolutif des populations.

Analyse et maintien du polymorphisme (ERA 406, université de Paris VII) = maintien du polymorphisme dans les populations.

Génétique physiologique des cellules d'insectes (drosophile) (ERA 615, université de Paris VI) = modulation du fonctionnement du matériel génétique des cellules de drosophile en culture, notamment sous l'effet des hormones ecdystéroïdes.

Morphogénèse expérimentale (ERA 621, université de Grenoble I) = différenciation *in vitro* des disques imaginaux.

Phénomènes d'hérédité non mendélienne chez la drosophile (ERA 692, université de Clermont-Ferrand) = un phénomène de spéciation impliquant un élément transposable.

La préparation à l'action dans le comportement animal (ERA 700, université de Toulouse III) = aspects génétiques et épigénétiques du comportement et de l'apprentissage.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Une génétique adaptée aux cellules d'organismes supérieurs : la génétique somatique

Faire « de la cellule de mammifère un microorganisme » : tel est le premier enjeu de la génétique somatique. Les attributs des microorganismes – qui ont permis le développement spectaculaire de la génétique bactérienne – faisant défaut aux organismes supérieurs, il a fallu trouver des artifices expérimentaux pour modifier l'information génétique d'une cellule en dehors du croisement sexué.

Gérard BUTTIN

Un profond bouleversement a été introduit en biologie au cours des années soixante, par la découverte des mécanismes généraux de stockage et d'expression de l'information héréditaire : en quelques années, la biologie moléculaire livrait les clés du code génétique, les lois d'assemblage des macromolécules informationnelles (acides nucléiques), les schémas des circuits de régulation mis en œuvre pour adapter le niveau d'activité d'un gène aux besoins d'une cellule. Le développement d'une génétique des organismes unicellulaires – bactéries et champignons – a joué un rôle décisif dans ces succès : l'isolement de variants et la mise en évidence d'échanges génétiques étaient faciles et rapides sur ces populations de cellules, homogènes dans leur patrimoine héréditaire comme le souhaitaient les généticiens, homogènes dans leur composition comme le désiraient les chimistes.

Cette stratégie était-elle adaptable pour analyser les processus biologiques propres aux organismes « supérieurs » ? L'organisme d'un animal ou d'une plante est une mosaïque de familles de cellules « somatiques » (hépatiques, musculaires, nerveuses, etc.) exerçant chacune une fonction « différenciée » propre. Individualisés au cours des divisions successives de l'œuf, par un mécanisme encore largement mystérieux, ces divers types cellulaires assument leur rôle particulier au sein du système intégré que constitue l'organisme. Lorsqu'ils ont atteint leur stade final de différenciation, ils ne reprennent qu'exceptionnellement une division active. De plus, les cellules des organismes pluricellulaires, cellules sexuelles mises à part, ne sont pas équipées pour les échanges de macromolécules informationnelles de cellules à cellules, condition de toute analyse génétique. Et cependant, parallèlement à la génétique microbienne, s'est constituée une génétique des cellules somatiques dont les réalisations constituent déjà une contribution irremplaçable aux conquêtes de la biologie moderne.

□ Gérard Buttin, professeur à l'université Pierre et Marie Curie, dirige le département de génétique cellulaire et immunologie de l'Institut de recherche en biologie moléculaire (Institut mixte CNRS – Université de Paris VII). Ses travaux portent d'une part sur l'analyse de la régulation de la croissance cellulaire, d'autre part, sur l'hybridation cellulaire et son application à des problèmes immunologiques.

Un préalable, l'établissement de lignées cellulaires

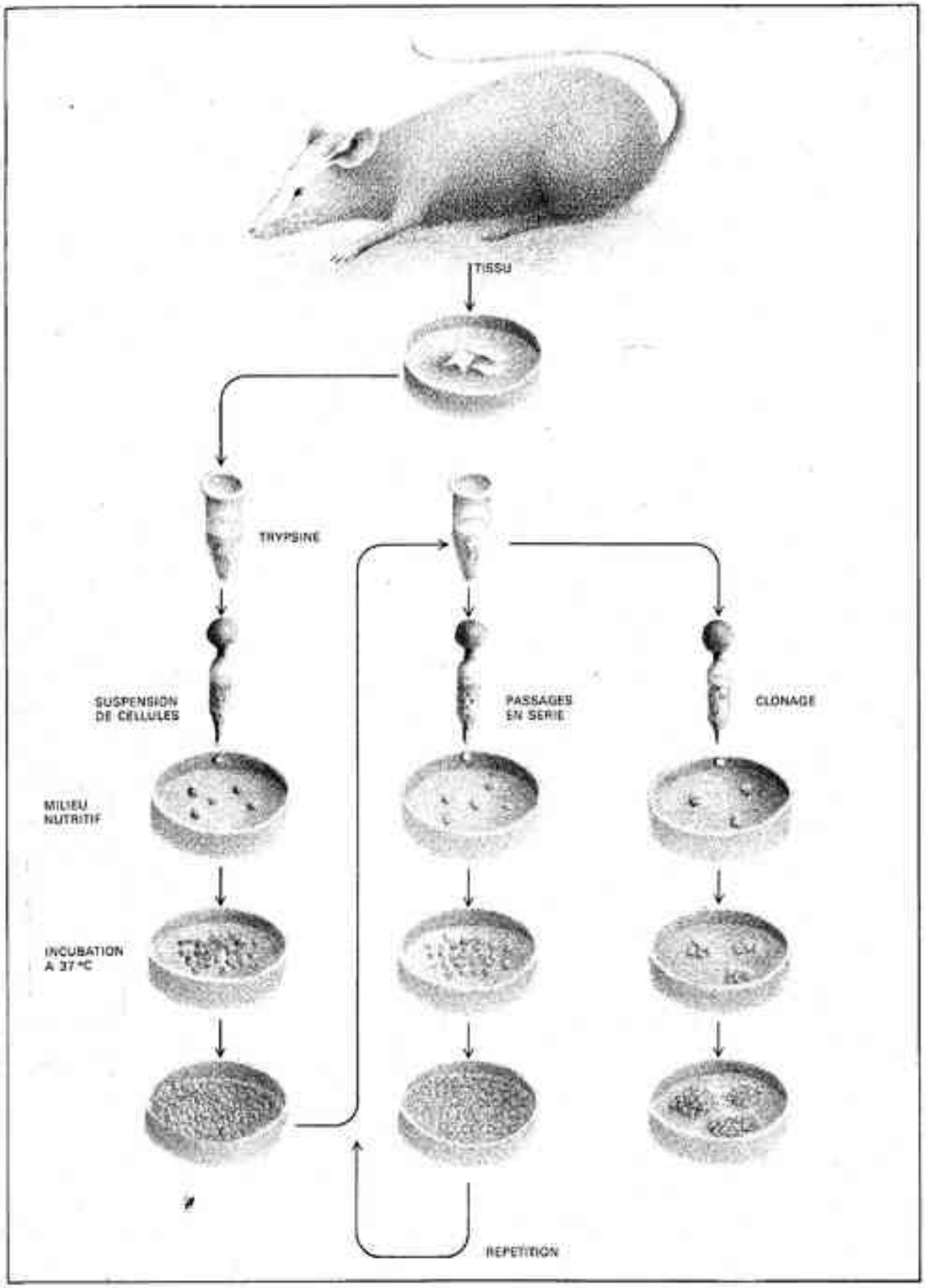
La première condition de l'existence de la génétique somatique était évidemment de disposer de lignées de cellules somatiques, capables de se diviser indéfiniment *in vitro*, et homogènes dans les caractères qu'elles expriment. Des efforts souvent ingrats ont permis d'élaborer des milieux de culture complexes et incomplètement définis, permettant la croissance de cellules faiblement différenciées (type « fibroblastiques »), ou de cellules d'origine tumorale que leur capacité anormale de division rendait plus aptes à proliférer dans des conditions précaires. La poursuite persévérante de ces recherches a abouti à l'établissement de lignées manifestant des types de différenciation extrêmement divers (musculaires, nerveux, lymphocytaires, glandulaires, etc.) et de lignées multipotentielles (tératocarcinome), que l'on commence à savoir induire à exprimer, en culture, des types de différenciation variés. L'identification de facteurs hormonaux, qui conditionnent la multiplication *in vitro* d'un type particulier de cellules, permet aujourd'hui de réaliser la culture de plusieurs types cellulaires (fibroblastes, lymphocytes T, etc.) dans des milieux totalement définis.

L'isolement de ces lignées cellulaires présente évidemment un intérêt pour l'analyse des mécanismes qui contrôlent la prolifération cellulaire normale et pathologique. Il ouvre aussi la possibilité d'examiner, dans des conditions de milieu enfin maîtrisées, l'effet de l'altération d'un gène particulier (mutation) sur une propriété exprimée par des cellules humaines par exemple, et permet d'étudier le mode d'action des agents pharmacologiques.

Les mutants cellulaires, leur obtention, leur utilité

Les agents pharmacologiques sont, en effet, des auxiliaires privilégiés des généticiens pour révéler des altérations génétiques dans les cellules somatiques en culture. L'isolement d'un mutant – individu rare, voire unique – au sein d'une population immense de cellules « sauvages », pose toujours un problème (1). Il est facilement résolu lorsque la mutation confère une aptitude à survivre dans des conditions où les cellules sauvages en cours de multiplication sont tuées, par exemple quand le milieu de culture contient des analogues toxiques de constituants cellulaires naturels entrant dans la composition des acides nucléiques (analogues utilisés en chimiothérapie anticancéreuse). Un mutant résistant peut alors se multiplier parce qu'un défaut génétique le rend inapte à synthétiser un enzyme nécessaire à

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf



L'établissement de lignées cellulaires. – Des fragments de tissu, provenant d'un animal ou d'un embryon, sont incubés avec un enzyme, comme la trypsine ; on obtient ainsi une suspension de cellules séparées. Ces cellules sont placées dans un milieu nutritif liquide et incubées : les cellules s'attachent au fond de la boîte et se divisent, formant une couche continue. A nouveau, l'action de la trypsine dissocie les cellules ; à nouveau l'inoculation d'une fraction importante des cellules dans un milieu renouvelé produit une couche de cellules. De tels passages en série produisent des cultures hétérogènes, car plusieurs types de cellules sont présents à l'origine. Par contre, si l'on inocule un petit nombre de cellules dispersées, on obtient des colonies formées de la descendance d'une seule cellule : ce sont des « clones ».

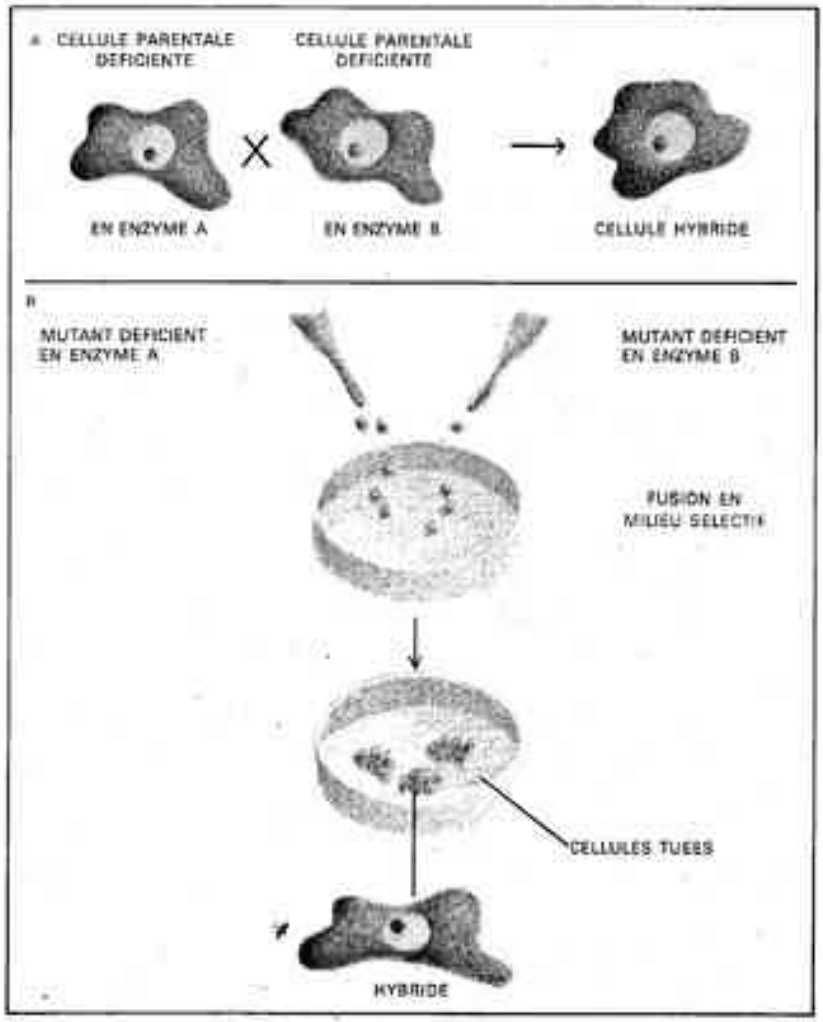
Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

l'incorporation mortelle de l'analogue dans les macromolécules biologiques. Le défaut génétique peut aussi avoir provoqué une aptitude à surproduire le constituant naturel avec lequel l'analogue toxique se trouve en compétition.

L'éventail des mécanismes de résistance cellulaire aux agents cytotoxiques s'est récemment élargi à la suite d'une observation inattendue : des populations cellulaires cultivées de façon prolongée en présence de certains analogues acquièrent très progressivement la résistance à ces analogues – c'est-à-dire qu'elles continuent à se multiplier si la drogue est ajoutée graduellement au milieu de culture –. Ce phénomène a maintenant été observé dans plusieurs systèmes où l'analogue est l'inhibiteur d'un enzyme essentiel à la croissance : la résistance est acquise par surproduction progressive de cet enzyme cible, dont l'activité résiduelle est ainsi maintenue à un niveau suffisant pour satisfaire les besoins cellulaires.

L'intérêt de ces observations paraît devoir déborder très largement le cadre de la pharmacologie : l'équipe californienne de Schimke a, en effet, établi sur un de ces systèmes (résistance au méthotrexate), que la surproduction d'enzyme résulte en fait d'une multiplication des copies du gène qui code pour cette protéine (2). La résistance des cellules est initialement instable. Les nombreuses copies du gène sont d'abord associées à des éléments génétiques extrachromosomiques ; on les retrouve ensuite regroupées au sein d'un chromosome : le gène est dit « amplifié », la résistance est alors stabilisée.

Les mutants de résistance constituent des outils d'une importance considérable pour comprendre l'origine de certaines « familles de gènes », constituées de plusieurs gènes voisins présentant une similitude évidente de structure ; ces groupes de gènes sont soupçonnés d'être les produits d'un processus d'amplification, modelés ensuite par l'évolution. Ce sont donc des systèmes expérimentaux permettant de reconstituer au laboratoire certains des mécanismes par lesquels peut être accru le potentiel génétique d'une cellule animale qui paraissent maintenant disponibles.



L'isolement des cellules hybrides. – (a) Les cellules hybrides sont engendrées par fusion d'une cellule capable de produire l'enzyme A, mais non B avec une cellule capable de produire B mais non A. – (b) Le système sélectif place les cellules dans des conditions où l'activité des deux enzymes A et B sont indispensables à la croissance. Les cellules parentales, déficientes en l'un des enzymes, meurent alors que les hybrides, qui seules possèdent les deux enzymes A et B, survivent et forment des colonies.

La production d'hybrides cellulaires

Le problème qui pouvait paraître le plus insurmontable pour faire – selon la formule de T. Puck – « de la cellule de mammifère un microorganisme », était l'absence de systèmes de confrontation et de redistribution de l'information génétique. Une première solution devait en être fournie en exploitant une observation réalisée dès 1960 par Barski, Sorieul et Cornefert : les cellules de mammifères en culture peuvent occasionnellement fusionner. Ephrussi démontrait peu après que ces cellules hybrides sont viables et peuvent se diviser, engendrant des lignées où persistent les patrimoines chromosomiques des deux parents (3).

Il est possible d'introduire dans les lignées établies de cellules somatiques des « marqueurs génétiques », représentés par des mutations abolissant l'activité d'un enzyme non indispensable à la croissance cellulaire dans les conditions habituelles de culture. Ceci a offert un moyen de résoudre le délicat problème posé par le dénombrement et l'isolement des rares colonies d'hybrides dispersées au sein des nombreuses colonies de cellules parentales. Un ingénieux système de sélection imaginé par Littlefield en 1964 est encore largement utilisé à cette fin : il consiste à modifier les conditions de culture pour rendre indispensables les activités simultanées de deux enzymes « marqueurs » dont l'un est déficient chez l'un des parents, l'autre chez le second parent : la fusion associe chez les hybrides l'aptitude à synthétiser les deux enzymes actifs, permettant leur croissance. L'introduction d'agents fusionnants – le virus agglutinant de Sendaï, puis des « fusogènes » chimiques (polyethylène-glycols) – a transformé la production d'hybrides en une opération de routine à forte efficacité. La confrontation systématique de deux génomes au sein d'un même cytoplasme

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

est devenue progressivement une technique courante aux applications variées.

Des hybrides interspécifiques pour établir la carte chromosomique d'une des deux espèces

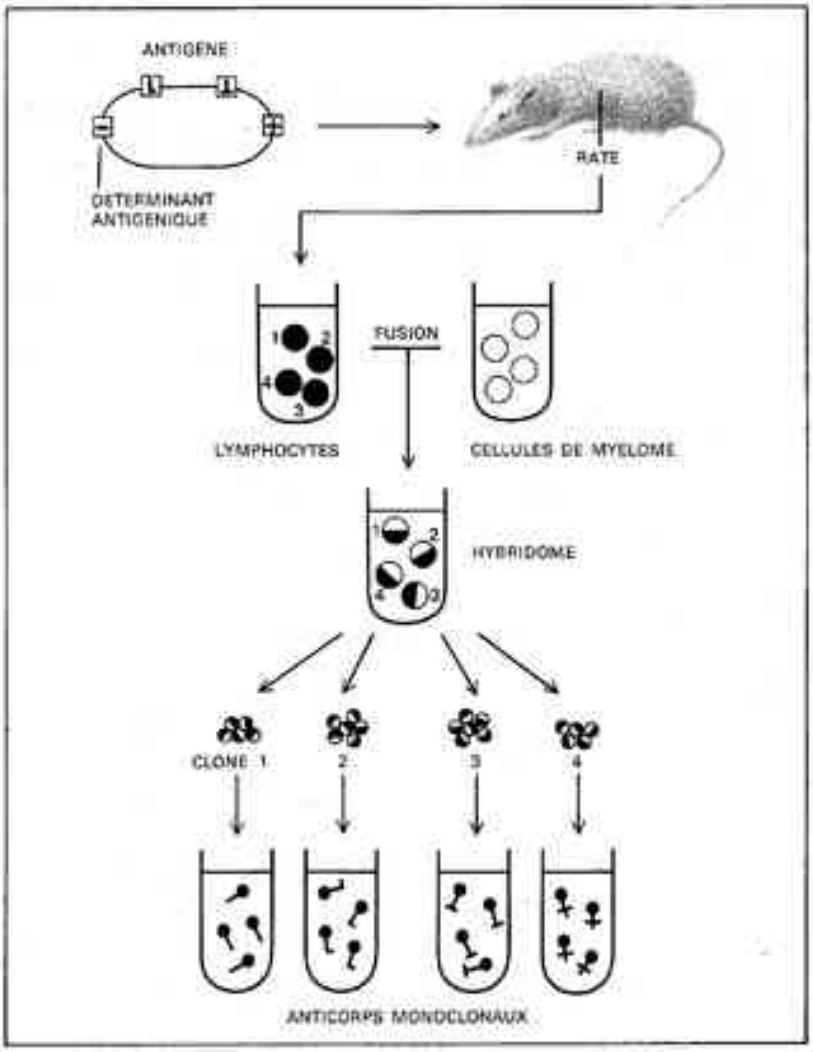
Avec l'obtention d'hybrides interspécifiques (résultant de la fusion de deux cellules issues d'animaux d'espèces différentes) réussie initialement par H. Harris, apparut une méthodologie d'analyse génétique nouvelle. En effet, non seulement la garniture chromosomique de ces hybrides est instable, mais comme l'a établi l'école d'Ephrussi, ces cellules en division peuvent perdre très préférentiellement le matériel génétique de l'un des parents. Les produits des fusions « homme-souris », notamment, perdent progressivement les chromosomes humains.

Une corrélation peut être établie entre la persistance au sein de l'hybride d'un chromosome humain particulier et la capacité des cellules correspondantes à synthétiser certains enzymes humains. On peut maintenant attribuer à chacun des chromosomes humains – que les progrès de la cytogénétique permettent tous d'individualiser – des gènes codant pour telle ou telle protéine. C'est ainsi que grâce à l'hybridation somatique interspécifique, et alors que les méthodes de la génétique classique étaient inapplicables, la carte chromosomique humaine s'établit (voir article page 47). Cette carte s'enrichit de plus d'un marqueur nouveau par mois, et de nouveaux développements technologiques devraient contribuer à en accélérer la construction. En effet, la formation induite par des agents antimitotiques, de « microcellules » ne comportant qu'un chromosome, a été réussie en Suède ; la fusion de ces microcellules avec des cellules d'une autre espèce permet de corréler directement, sans attendre l'élimination des chromosomes d'un des parents, l'introduction des gènes du chromosome surnuméraire avec la capacité de la cellule réceptrice à synthétiser de nouveaux enzymes.

Des hybrides intraspécifiques au service de la biotechnologie : les hybridomes

L'intérêt de l'hybridation intraspécifique, longtemps confiné aux laboratoires spécialisés, est apparu brusquement à un vaste public, lorsque la fusion cellulaire s'est révélée la technique de choix pour réaliser un rêve longtemps caressé par tout immunologiste : la production en quantité indéfinie d'anticorps homogènes de spécificité prédéterminée (4). Pour cela, on prépare des cellules de rate, – où se différencient les lymphocytes – en préimmunisant une souris par un antigène : de nombreux lymphocytes secrètent alors un anticorps dirigé contre cet antigène. Ces cellules étant incapables de proliférer *in vitro*, on les fait fusionner avec des cellules d'une lignée myelomateuse (tumeur provenant elle-même de la prolifération incontrôlée d'un lymphocyte). L'hybridation engendre des lignées permanentes au patrimoine génétique stable et secrétrices de l'anticorps particulier que la cellule normale correspondante avait la capacité de synthétiser : ce sont les « hybridomes ». Kohler et Milstein, qui ont les premiers obtenu ce type d'hybridation, ont ainsi révélé l'existence et les potentialités de la génétique somatique à un large public, dépassant de loin l'audience acquise par l'ensemble des publications antérieures dédiées à cette discipline. Plusieurs dizaines d'anticorps, spécifiques de déterminants antigéniques variés, sont déjà commercialisés ; la production industrielle de certains anticorps de diagnostic médical est envisagée. Les perspectives d'utilisation thérapeutique d'anticorps vecteurs de toxine, ayant pour cible un antigène particulier à des cellules cancéreuses, ne paraissent pas hors de portée.

Les techniques de fusion ont d'autres applications qui seront décrites dans ce numéro : pour la génétique du cancer



La production d'anticorps monoclonaux : les hybridomes. – En injectant à un animal un antigène portant plusieurs « déterminants » antigéniques, on détermine une réponse immunitaire caractérisée par la prolifération de plusieurs lignées de lymphocytes qui sécrètent chacune une molécule d'anticorps correspondant à l'un – ou même à une partie – des « déterminants » antigéniques. Si l'on fait fusionner ces lymphocytes provenant de la rate avec des cellules de myélome (tumeur lymphocytaire), on obtient des « hybridomes » qui se multiplient d'une manière indéfinie. Clonés, ces hybridomes peuvent donc fournir en grande quantité des anticorps homogènes de spécificité prédéterminée.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Deux cybrides de tabac. Leur morphologie florale caractéristique a pour origine une modification des gènes cytoplasmiques, obtenus par fusion de protoplastes issus de variétés différentes (Laboratoire d'étude et d'exploitation du polymorphisme végétal, université de Paris-Sud – LA 115).

L'APPLICATION AUX CELLULES VEGETALES

Lorsque la cellule végétale est débarrassée de sa paroi pectocellulosique, le protoplaste ainsi obtenu se prête à des manipulations de fusion cellulaire. La fusion somatique représente pour le généticien et le sélectionneur un moyen d'obtenir, par voie parasexuelle, des plantes irréalisables par la voie naturelle des croisements (à la condition qu'il s'agisse d'espèces pour lesquelles les conditions de régénération *in vitro* de plantes entières à partir de cellules isolées soient bien maîtrisées, ce qui est le cas des plantes de la famille des solanacées : pomme de terre, tabac, petunia etc...). Cette méthodologie recule donc les barrières naturelles qui limitent les échanges de gènes puisqu'on peut faire fusionner des protoplastes de variétés, voire d'espèces différentes.

En outre, la fusion de deux protoplastes permet d'élargir la variabilité génétique cytoplasmique. En effet, chez les plantes supérieures, la fécondation est un système de transmission uni-parentale du cytoplasme, le plus souvent d'origine maternelle. Cela signifie que l'information génétique des chloroplastes et des mitochondries qui intervient, en étroite interaction avec l'information nucléaire, dans le développement de la plante, par exemple au niveau de la floraison, n'est pas échangée au cours des croisements.

La fécondation qui est source de variabilité pour les gènes nucléaires ne l'est donc pas pour les gènes cytoplasmiques. Par contre, la fusion somatique se révèle être un système de transmission biparentale des cytoplasmes. Elle permet d'obtenir toutes les combinaisons possibles entre les génomes cellulaires : nucléaire, chloroplastique et mitochondrial. D'autre part, elle permet de réaliser des plantes qui sont des hybrides cytoplasmiques que l'on appelle des cybrides.

Ces cybrides présentent des morphologies florales nouvelles (voir illustration) qui sont toujours transmises de façon maternelle et apparaissent parfaitement stables au cours des générations sexuées. Les cybrides représentent un gain de variabilité considérable pour le sélectionneur, et sont un outil nouveau pour la génétique cytoplasmique chez les plantes supérieures.

(voir article page 37), pour expliquer le fonctionnement des gènes au cours de la différenciation des cellules (voir article page 40), et pour obtenir des plantes hybrides (voir encadré ci-contre).

La dernière-née des techniques de génétique somatique : la transformation directe des cellules par de l'ADN

Cependant, l'intérêt des techniques de fusion paraît déjà sur le point d'être supplanté par celui d'une technique d'association de déterminants génétiques beaucoup plus fine que l'hybridation : la transformation des cellules animales par incorporation directe de molécules d'ADN purifiées (5). Introduits par micromanipulation dans le noyau cellulaire, des gènes d'origine quelconque se retrouvent – au mépris apparent des lois de la recombinaison génétique classique – intégrés au sein du génome des cellules réceptrices avec une efficacité stupéfiante. Greffer un gène quelconque dans une cellule quelconque ne paraît plus une réalisation du domaine de la science-fiction. Ainsi le biologiste américain Cline vient-il de montrer qu'il était possible d'extraire de cellules en culture les gènes « amplifiés » qui confèrent la résistance au méthotrexate, puis d'intégrer ces gènes dans des cellules souches de la lignée des cellules sanguines de souris et, après réinjection de ces cellules transformées à une souris, d'imposer le repeuplement du compartiment où se différencient les cellules sanguines (moelle osseuse) par des cellules résistantes (6).

Ces technologies, bénéficiant de la production de gènes purifiés naturels ou artificiels par le génie génétique, ouvrent dans le domaine médical, des perspectives peut-être lointaines, mais impressionnantes. On commence à se représenter ce que seront les méthodes de la génétique somatique de la décade qui commence ; il serait plus hasardeux de faire des pronostics sur la limite des réalisations qui découleront de l'exploitation de ces méthodes...

BIBLIOGRAPHIE

(1) T.T. Puck, *The mammalian cell as a microorganism*. (1972). Holden Day, Inc. San Francisco.
(2) R.T. Schimke, R.J. Kaufman, F.W. Alt et R.F. Kellems : « Gene amplification and drug resistance in cultured murine cells ». *Science* (1978), 202, 1051.
(3) B. Ephrussi. *Hybridization of somatic cells*. (1972). Princeton univ. press, Princeton.
(4) G. Buttin et P.A. Cazenave : « L'hybridation des cellules lymphocytaires ». *Bull. Inst. Pasteur* (1980), 78, n° 1, 7-47.
(5) M.J. Cline, H. Stanz, K. Mercola, L. Morse, R. Ruprecht, J. Brown et W. Salser : « Gene transfer in intact animals ». *Nature* (1980), 284, 422.
(6) M.R. Capecchi : « High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells ». *Cell* (1980), 22, 479.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

De la génétique somatique à l'étude des cancers

En faisant fusionner des cellules cancéreuses avec des cellules normales, on obtient des cellules hybrides dont l'étude contribue à élucider le rôle du matériel génétique dans le développement des tumeurs. On peut d'ailleurs trouver de tels hybrides dans des tumeurs de l'homme et de l'animal.

Jacques JAMI

De nombreux arguments plaident pour l'intervention du matériel héréditaire dans le processus de cancérisation. Dans certaines tumeurs animales d'origine virale, des gènes du virus mis en cause sont intégrés dans l'ADN de la cellule « transformée » ; dans la cancérogénèse chimique, l'ADN des cellules est lésé en plusieurs endroits ; enfin, en dehors de toute intervention extérieure, il peut se produire des erreurs dans le fonctionnement cellulaire parce qu'il y a un dérèglement des gènes qui contrôlent ce fonctionnement.

Dans le cadre des études entreprises sur le déterminisme génétique des cancers, l'hybridation des cellules somatiques en culture, découverte en 1961 à Villejuif par Georges Barski et développée systématiquement par Boris Ephrussi, est utilisée en premier lieu pour préciser si les cellules cancéreuses possèdent des gènes fonctionnels que les cellules normales n'ont pas, ou, au contraire, si des gènes fonctionnels normaux manquent dans les cellules cancéreuses.

Les hybrides obtenus par fusion de cellules cancéreuses avec des cellules normales sont-ils eux-mêmes cancéreux ?

On fait fusionner des cellules normales avec des cellules cancéreuses ; les hybrides contiennent la somme des chromosomes des deux cellules parentales. Après un certain nombre de divisions cellulaires indispensables pour obtenir un nombre de cellules hybrides suffisant à leur étude, on injecte ces hybrides à des animaux pour tester leur malignité, c'est-à-dire leur capacité à avoir un développement tumoral qui entraîne la mort des hôtes.

De très nombreux croisements de ce type ont été réalisés. Très souvent, les hybrides obtenus se sont avérés avoir conservé la capacité tumorale des cellules parentales cancéreuses. Dans d'autres cas, les hybrides avaient apparemment perdu cette propriété ; c'est ce qu'on a appelé la « suppression de la malignité » ; mais la capacité tumorale de ces hybrides pouvait reparaître secondairement, et cette réapparition coïncidait avec la perte d'un nombre important de chromosomes originaires de la cellule parentale normale.

La malignité des hybrides est-elle le résultat de la perte de chromosomes ?

Henry Harris à Oxford et George Klein à Stockholm, ont alors émis l'hypothèse que la croissance tumorale des hybrides n'était possible qu'à la condition que ces hybrides aient préalablement éliminé des chromosomes spécifiques de la cellule parentale normale. Autrement dit, dans cette hypothèse, la malignité serait une lésion défective corrigée par le génome de la cellule parentale normale présent dans l'hybride, puis reparaissant si l'hybride perdait les facteurs de correction apportés par la cellule normale.

Cette hypothèse impliquait qu'il manque dans les tumeurs hybrides au moins une paire spécifique de chromosomes, provenant de la cellule parentale normale. Cette absence de chromosomes spécifiques dans les tumeurs hybrides a été recherchée (fig. 1 et 2). Malgré tous les efforts, cet argument décisif n'a jamais été apporté. Bien au contraire, plusieurs laboratoires ont montré que n'importe lequel des chromosomes de la cellule parentale normale pouvait être retrouvé dans des tumeurs hybrides, ce qui n'est pas compatible avec l'hypothèse que nous venons d'évoquer. De plus, les hybrides entre deux cellules cancéreuses d'origine tissulaire différente sont toujours eux-mêmes cancéreux ; or, à moins d'admettre que les mêmes gènes sont responsables de tous les cancers, on s'attendrait, s'il s'agit de lésions défectives, à observer des corrections mutuelles de génomes portant des lésions différentes.

Au total, la suppression de la malignité dans les hybrides n'a pas encore trouvé d'explication claire. Les arguments indirects mentionnés ci-dessus suggèrent qu'il ne s'agit pas de la restauration de fonctions normales par des gènes spécifiques portés par un chromosome de la cellule parentale non maligne. Il ne s'agit pas non plus d'un phénomène contrôlé par un facteur présent dans le cytoplasme de la cellule normale : en effet, la fusion de noyaux de cellules tumorales avec des cellules non malignes préalablement énucléées, aboutit à des « cybrides » qui conservent les propriétés malignes de la cellule parentale tumorale.

La malignité est-elle due à l'arrêt du fonctionnement de certains gènes ?

Une autre explication de la suppression de la malignité dans les cellules hybrides peut être envisagée. On sait que la fusion de deux cellules n'ayant pas le même état de différen-

☐ Jacques Jami est maître de recherche à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale. Il dirige le laboratoire de génétique physiologique de l'Institut de recherche en biologie moléculaire, CNRS – Université de Paris VII.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

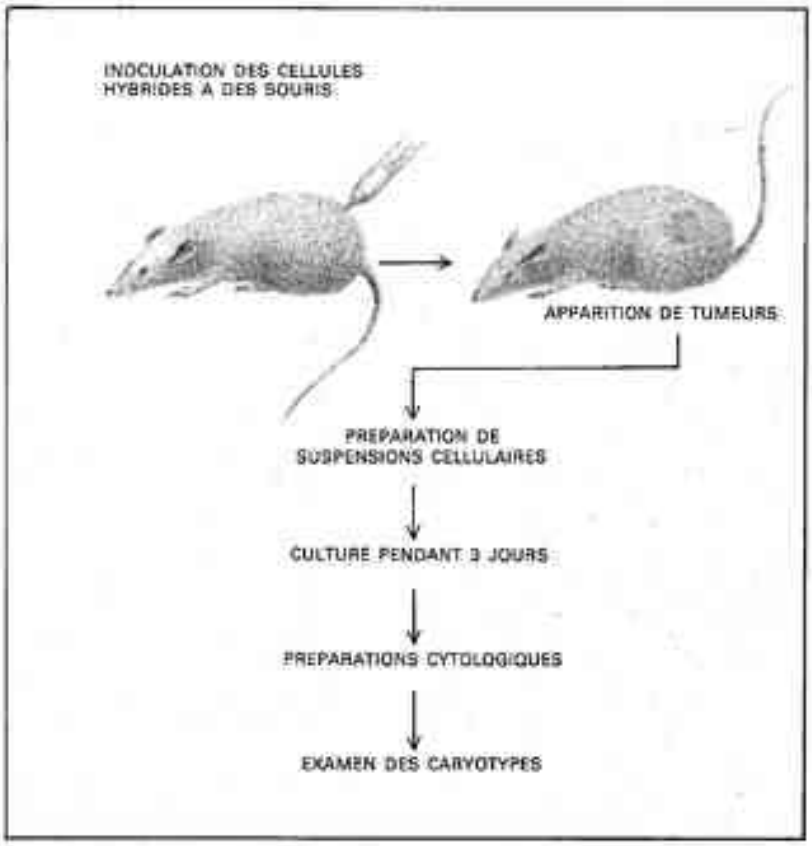


Fig. 1 – Principe des expériences destinées à rechercher une liaison entre des chromosomes et le caractère cancéreux des hybrides cellulaires.

ciation (par exemple une cellule hépatique et une cellule du tissu conjonctif) aboutit généralement à l'extinction de l'expression des fonctions différenciées de l'une des cellules parentales (voir article p. 42). Il est possible que l'expression de gènes impliqués dans la malignité de cellules cancéreuses soit liée à celle d'un stade précis d'un programme de différenciation déterminé. Si, après fusion avec une autre cellule, ce stade est dépassé, ou encore si le génome est reprogrammé pour exprimer d'autres fonctions, la malignité pourrait alors être supprimée. On invoque un mécanisme semblable pour expliquer la disparition des propriétés cancéreuses des neuroblastomes humains bien différenciés et des cellules de tératocarcinome différenciées et formant des tissus divers. La réapparition secondaire de la malignité dans les hybrides qui ont perdu des chromosomes de la cellule parentale normale pourrait de même être un effet secondaire de la réapparition de caractères différenciés de la cellule parentale cancéreuse après perte de chromosomes. A cet égard, il est remarquable que les hybrides tumoraux obtenus en faisant fusionner des cellules cancéreuses avec des cellules non cancéreuses d'une autre origine tissulaire aient toujours le type tissulaire

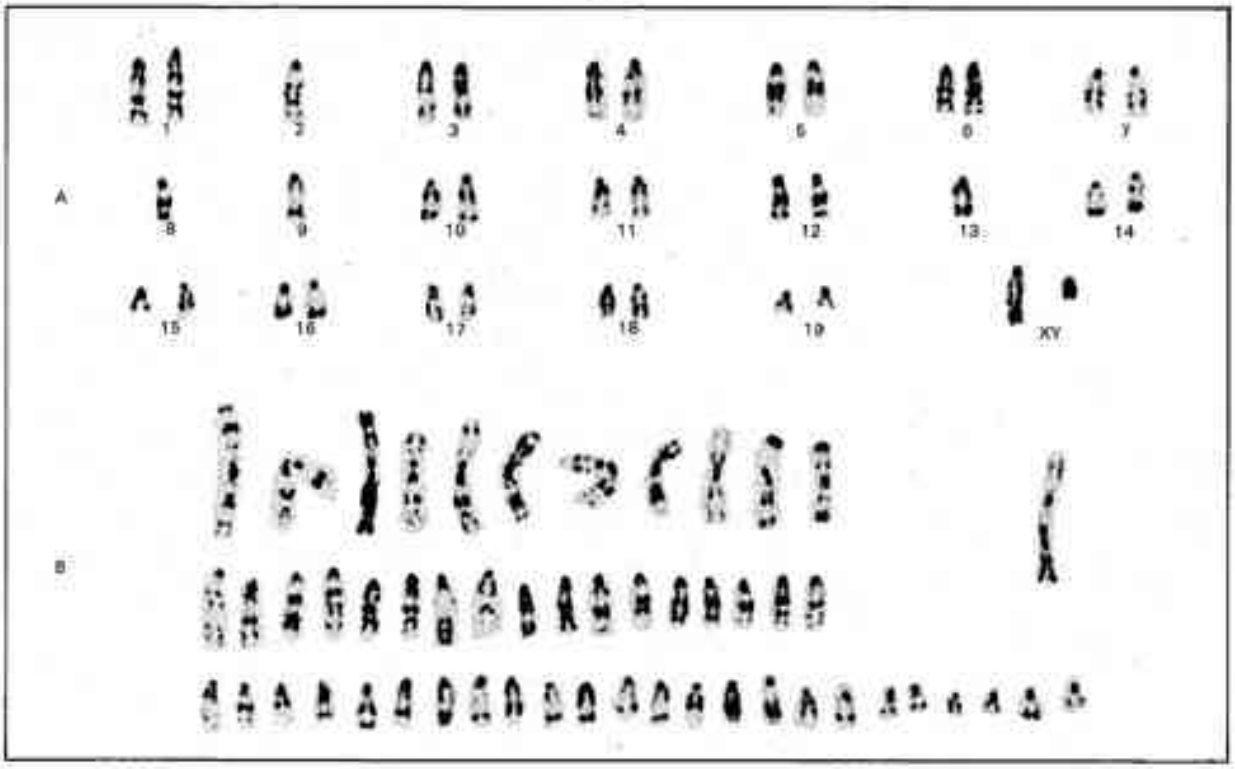


Fig. 2 – Chromosomes d'une cellule hybride tumorale (caryotype). Il s'agit d'un hybride entre deux cellules de souris, l'une tumorale et l'autre normale, provenant toutes deux du tissu conjonctif. Tous les chromosomes de la cellule parentale normale ont été individuellement identifiés et classés en A. Tous les autres chromosomes, classés en B, proviennent de la cellule parentale tumorale ; (il n'est pas habituel que tous les chromosomes d'une cellule tumorale soient à ce point modifiés ; mais c'est cette particularité qui a permis la réalisation de cette analyse). Cliché D. Aviles.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

de la cellule parentale cancéreuse. C'est ainsi, par exemple, que les hybrides malins de cellules de tératocarcinome et de lymphocytes normaux sont toujours des tératocarcinomes.

La possibilité que la suppression de la malignité soit due à l'arrêt de l'expression de gènes impliqués dans la malignité de ces cellules a une importance considérable. Elle suggère d'abord que la modification expérimentale de cellules cancéreuses peut conduire à un retour à un comportement normal. Elle invite ensuite à poursuivre les études expérimentales en accordant la plus grande attention aux caractères différenciés des deux cellules parentales, la cancéreuse et la normale, et à ceux de leurs hybrides. D'autre part, quand des hybrides sont obtenus en fusionnant des cellules de même différenciation, les hybrides ont la même différenciation que les deux cellules parentales, et les génomes réunis contribuent également à la réalisation de cette différenciation.

Obtenir des hybrides ayant perdu des chromosomes de la cellule parentale cancéreuse

C'est pourquoi les hybrides de cellules cancéreuses et de cellules normales qui sont dans le même état de différenciation, pourraient représenter le matériel de choix pour des études visant à déterminer le ou les chromosomes dont la présence est indispensable à l'expression des propriétés cancéreuses des hybrides préparés à partir de telle ou telle tumeur.

De telles études nécessitent l'isolement d'hybrides dans lesquels des chromosomes de la cellule parentale cancéreuse ont été éliminés. La corrélation des propriétés cancéreuses avec les chromosomes qui sont conservés par les hybrides devrait alors permettre de déceler ceux des chromosomes de la cellule parentale cancéreuse qui peuvent porter les gènes impliqués dans la malignité de la tumeur étudiée.

On sait que les hybrides de cellules provenant d'espèces animales différentes éliminent de façon préférentielle beaucoup des chromosomes de l'une des deux cellules parentales (voir p. 48). On a pensé utiliser cette propriété pour obtenir des hybrides qui ne conservent que quelques-uns des chromosomes de la cellule parentale cancéreuse. Malheureusement, ces travaux n'ont pu jusqu'ici aboutir, car un autre phénomène s'est manifesté et a empêché l'obtention d'un tel matériel : les hybrides entre des cellules tumorales et des cellules normales éliminent toujours préférentiellement des chromosomes de la cellule parentale normale et conservent les chromosomes de la cellule parentale tumorale. Cette perte préférentielle orientée, trouvée dans les hybrides de cellules somatiques provenant de la même espèce animale, est illustrée de façon spectaculaire par les hybrides de cellules somatiques provenant de deux espèces différentes. Si on fait fusionner des cellules tumorales de souris avec des cellules normales de hamster chinois, ce sont toujours des chromosomes de hamster qui sont perdus ; si on inverse le sens du croisement et qu'on fait fusionner des cellules tumorales de hamster avec des cellules normales de souris, ce sont toujours des chromosomes de souris qui sont éliminés (fig. 3).

Aussi, pour obtenir des hybrides n'ayant que quelques chromosomes de la cellule parentale cancéreuse, plusieurs laboratoires tentent actuellement de fusionner des cellules non tumorales entières avec des microcellules préparées à partir de cellules tumorales (les microcellules sont des éléments dont le noyau ne contient que quelques-uns des chromosomes de la cellule à partir de laquelle ils ont été préparés).

Les hybrides spontanés dans les tumeurs

Il y a quelques années, on s'est rendu compte que, lors de la croissance tumorale de cellules cancéreuses de souris, il se forme spontanément des hybrides entre des cellules tumorales et des cellules de l'animal. L'origine de ces dernières cellules n'a pu être déterminée. Dans des systèmes expérimentaux permettant la sélection et l'identification de ces hybrides, on a pu montrer que leur présence est constante dans les tumeurs de souris étudiées. Ces hybrides sont eux-mêmes cancéreux.

Si l'on prend en considération que les hybrides entre des cellules tumorales et des cellules normales perdent toujours des chromosomes de la cellule parentale normale ; que beaucoup de tumeurs naturelles sont formées de cellules contenant des nombres irréguliers et variables de chromosomes ; et que par ailleurs, le dosage des gènes semble intervenir dans le degré de malignité exprimé par les hybrides, l'on est en droit de se poser la question de l'existence et du rôle éventuels de tels hybrides spontanés dans les tumeurs naturelles de l'animal et également de l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

A.C. Braun, *The cancer problem* (1969), Columbia University Press, New York.

B. Ephrussi, *Hybridization of somatic cells* (1972), Princeton University Press, Princeton (New Jersey).

N. Ringertz, R.E. Savage, *Cell hybrids* (1976), Academic Press, New York.

D. Avilès, E. Ritz, J. Jami, « Chromosomes in tumors derived from mouse tumor x diploid cell hybrids obtained in vitro » (1980), *Somat. Cell Genet.* 6, p. 171-186.

C. Lasserre, J. Jami, D. Avilès, « Patterns of chromosome segregation in Chinese hamster x mouse cell hybrids between permanent cell lines and thymus cells », *J. Cell. Physiol.* 104, p. 403-413.

Fig. 3 – Chromosomes d'une cellule hybride hamster chinois x souris. La coloration utilisée permet de distinguer l'origine parentale des chromosomes ; seuls les chromosomes de souris ont, dans la région du centromère (emplacement où les deux sous-unités de chromosomes sont reliées), une masse fortement colorée (les cellules parentales utilisées, en particulier celle de souris, ont des chromosomes très modifiés par rapport aux chromosomes des cellules somatiques normales). Cliché D. Avilès.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Des cellules hybrides pour étudier la différenciation cellulaire

Des gènes présents qui s'expriment dans certaines cellules et non dans d'autres : tel est le problème de la différenciation cellulaire. Les cellules issues de la fusion de cellules d'hépatome de rat et de fibroblastes de souris constituent un système expérimental où l'on peut induire ou réprimer la production d'une protéine correspondant à l'expression d'un gène de différenciation.

Mary C. WEISS

La différenciation cellulaire est l'un des problèmes les plus complexes auquel est confronté le biologiste. La raison en est simple : toute cellule du corps contient le même jeu de gènes, mais seulement une petite fraction de ces gènes est exprimée dans une cellule donnée : ainsi s'expriment dans une cellule de foie des gènes qui sont « silencieux » dans une cellule de muscle. Comprendre les mécanismes responsables de l'expression des gènes est aussi à la base de recherches sur beaucoup de maladies, de malformations, de tumeurs. Le chercheur qui étudie ce problème a donc un double objectif : comprendre un problème clef de la biologie et contribuer à résoudre des problèmes de pathologie.

Des gènes pour des protéines de différenciation

Rappelons en premier lieu que chaque cellule exprime deux classes de gènes. Tout d'abord, une classe commune à toute cellule, microorganisme aussi bien que cellule d'organisme supérieur : ce sont les gènes qui spécifient les protéines nécessaires à la vie de la cellule et assurent les « fonctions de ménage », c'est-à-dire celles qui interviennent dans la production d'énergie, la synthèse des protéines et des ARN, et, pour les cellules ayant la capacité de se diviser, de toute la machinerie nécessaire à recopier l'ADN, matériel génétique organisé dans les chromosomes, dont un lot entier se trouve dans chaque cellule-fille. Chez les organismes supérieurs, il existe une deuxième classe de gènes, ceux qui spécifient les protéines propres à un type de différenciation donnée. Chez les vertébrés, on trouve ainsi des dizaines de types de cellules différents, et chacun synthétise un spectre de protéines particulières : ce sont les protéines de « différenciation » qui sont responsables de la forme et de la fonction de cellules aussi diverses que celles des muscles, du foie, ou du système nerveux. Nous parlerons dans cet article de la régulation de l'expression de gènes spécifiant les protéines de différenciation, en laissant de côté les processus qui interviennent au cours du développement embryonnaire et aboutissent à l'état de différenciation final.

Deux aspects de la régulation de l'expression de gènes de différenciation restent particulièrement mystérieux. Le premier, c'est que la capacité d'une cellule à exprimer ses gènes de différenciation est héritable au cours des divisions cellulaires : il doit donc exister des mécanismes responsables du maintien de l'expression de ces gènes, mécanismes forcément renouvelés à chaque division cellulaire. Le deuxième, c'est que chaque cellule différenciée exprime seulement les gènes de sa propre différenciation, à l'exclusion de tout gène impliqué dans un autre type de différenciation. Autrement dit, il existe des mécanismes de régulation qui assurent non seulement l'expression de gènes spécifiques, mais aussi la non-expression de gènes appartenant à un autre type de différenciation. Il est particulièrement frappant de noter que ces derniers sont la majorité, vu le grand nombre de types de cellules et le nombre encore plus grand de protéines qui les caractérisent.

La mise au point par B. Ephrussi d'un modèle expérimental

Chez les bactéries, l'existence et le mode d'action de gènes de régulation (c'est-à-dire de gènes dont le rôle est de contrôler l'expression d'autres gènes) ont été découverts il y a presque vingt ans, et ceci grâce à l'utilisation des techniques d'analyse génétique. L'analyse génétique est basée sur l'étude de systèmes expérimentaux : des mutants où le fonctionnement d'un gène est modifié, ou des hybrides réalisés à partir de mutants. Seul, ce type d'analyse permet d'étudier le rôle fonctionnel du produit d'un gène dans le contrôle de l'expression d'autres gènes (voir p. 15).

Pour l'analyse génétique des cellules d'organismes supérieurs, la découverte de la fusion de cellules somatiques – processus qui aboutit à la réunion dans un seul noyau hybride des deux lots de gènes provenant de deux cellules différentes – a constitué un événement décisif. Il devient alors possible de confronter les gènes de deux cellules de différenciation distincte. Dans ce type d'hybridation, il ne s'agit en fait pas de vrais mutants, mais de cellules différenciées se comportant comme des mutants car elles diffèrent par les gènes de différenciation exprimés.

B. Ephrussi et ses collaborateurs ont été les premiers à réaliser un croisement entre cellules de différenciation distincte pour étudier la régulation de l'expression de la différenciation cellulaire. Ils disposaient d'une part de lignées de cellules pigmentées d'un méla-

□ Mary C. Weiss est maître de recherche au CNRS. Elle anime, au sein du Centre de génétique moléculaire du CNRS à Gif-sur-Yvette, un groupe dont l'objectif est l'étude du mécanisme de la différenciation hépatique. Elle est, avec H. Green et B. Ephrussi, à l'origine de la découverte de la ségrégation des chromosomes humains dans les hybrides cellulaires homme-souris.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

nome de hamster, et d'autre part de fibroblastes de souris, dérivés du tissu conjonctif et donc ne synthétisant pas de pigment. Ils se sont posés la question suivante : comment vont être exprimés les gènes de différenciation, en l'occurence ceux impliqués dans la synthèse de pigment, lorsque les deux lots de gènes sont réunis dans une cellule hybride ? Notons que les deux types cellulaires provenaient d'espèces différentes et qu'il était donc possible, par des critères physicochimiques, de distinguer les protéines des deux espèces. Utilisant les techniques de fusion et de sélection des hybrides (voir p. 34), ces chercheurs ont isolé des cellules hybrides viables, capables de prolifération continue.

Il a été montré que les protéines de « ménage », c'est-à-dire celles nécessaires à la survie de toute cellule, étaient spécifiées par les gènes des deux parents. Les gènes de « ménage » des deux parents étaient donc exprimés. Cependant, résultat surprenant, les cellules hybrides ne synthétisaient pas de pigment : il y avait un blocage spécifique de l'expression des gènes de différenciation. B. Ephrussi a émis l'hypothèse que la régulation de l'expression d'un gène de différenciation, s'effectuerait par l'action d'un produit diffusible dont l'action finale est négative (diffusible, car son action s'effectue sur les gènes des deux parents, et donc sur des chromosomes différents). Ce blocage spécifique de l'expression de gènes de différenciation a été dénommé extinction.

Une expérience d'hybridation interspécifique entre cellules de différenciation distincte

Avec mes collaborateurs, j'ai décidé de poursuivre cette ligne de recherche ouverte par les travaux de pionnier de B. Ephrussi. Maryvonne Mével-Ninio, notamment, a effectué une expérience qui illustre les phénomènes de régulation révélés par l'hybridation de cellules de différenciation distincte, et que je vais décrire.

En général, on examine les propriétés des cellules hybrides un mois après la fusion ; ce délai est nécessaire pour disposer d'un nombre de cellules hybrides suffisant pour effectuer des dosages biochimiques. On réalise un croisement, et les cellules hybrides viables forment des colonies ; par repiquage, on obtient un nombre suffisant de cellules hybrides. Les hybrides ainsi obtenus permettent de connaître le résultat final des interactions entre les gènes des cellules parentales, mais non de savoir quand et comment elles s'effectuent. Mais notre problème est d'examiner les évènements précoces qui interviennent juste après la fusion. Pour cela, nous avons mis au point un test immunocytochimique spécifique pour le produit d'un gène de différenciation (fig. 1) ; ainsi décèle-t-on le produit du gène dans des cellules individuelles à tout moment après la fusion.

Le système de différenciation que nous étudions est la différenciation hépatique, abordable dans des cellules en culture grâce à des lignées d'hépatome, tumeur pouvant affecter l'hépatocyte. Les cellules de certaines de ces tumeurs expriment en culture continue les gènes de différenciation propres à l'hépatocyte. La sérum albumine, synthétisée et sécrétée uniquement par l'hépatocyte, est le produit principal de différenciation de cette cellule. Nous examinons la synthèse de cette protéine à la suite de la fusion entre cellules d'un hépatome de rat et de fibroblastes de souris. Notons que nous avons affaire ici à un croisement interspécifique, entre cellules de rat et de souris. Il est donc possible de déterminer dans le cas où les cellules hybrides synthétisent de l'albumine, si celle-ci est de type rat ou de type souris.

La fusion est induite dans des populations mixtes contenant les deux types de cellules parentales. Des échantillons sont examinés à des stades divers. On trouve d'abord des cellules plurinucléées, dont les noyaux – deux au moins – correspondent aux deux types parentaux : ce sont des hétérocaryons. On rencontre aussi des homocaryons, résultant de la fusion de cellules de même type, ainsi que des cellules non fusionnées. Il est donc indispensable de pouvoir reconnaître l'origine de chaque noyau (fig. 2). Au bout d'un moment (24 à 48 heures après la fusion), les hétérocaryons ont tendance à disparaître : les noyaux fusionnent, de vraies cellules hybrides se forment. Puis, les cellules hybrides commencent à se diviser, formant des colonies.

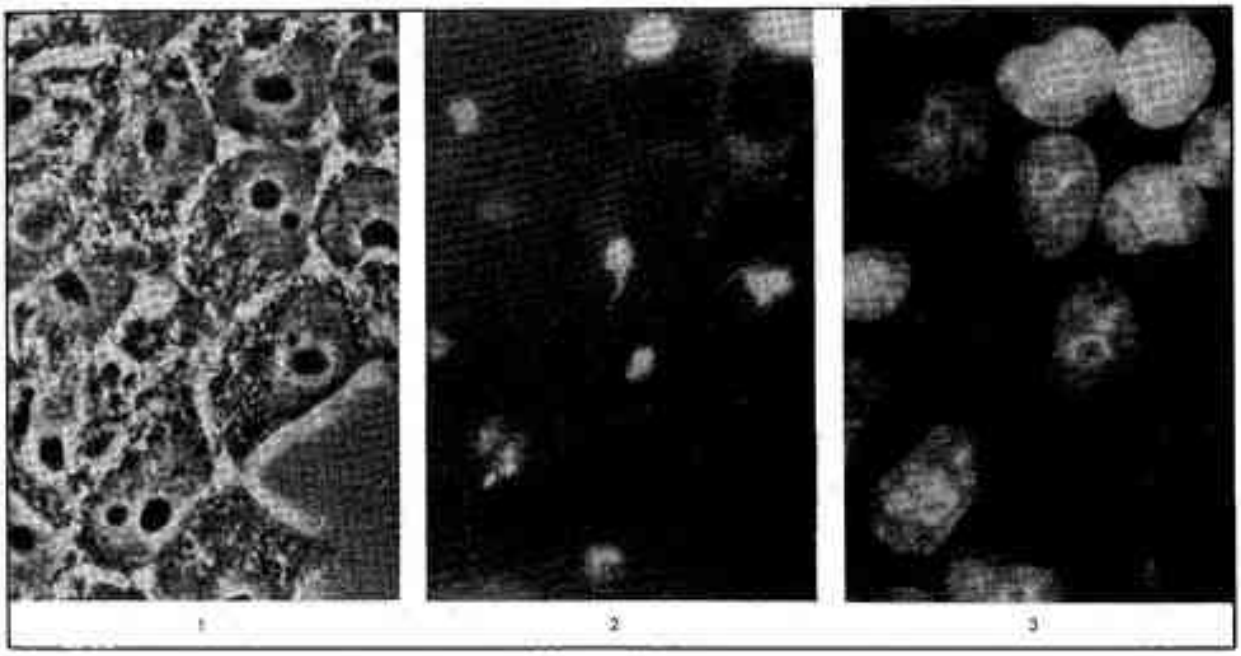


Fig. 1 – Cellules d'hépatome de rat : 1. des cellules ; 2. révélation par immunofluorescence de l'albumine intracellulaire ; 3. coloration des noyaux. (voir fig. 2 pour l'explication des techniques). Ces cellules servent à la production d'hybrides.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

D'abord, production de la protéine de différenciation, puis arrêt de cette production

Les hétérocaryons résultant de la fusion de cellules d'hépatome et de fibroblastes de souris synthétisent l'albumine pendant les premières heures après la fusion (fig. 2). Cette synthèse est maintenue pendant 12 heures. Ensuite, tous les hétérocaryons cessent de synthétiser cette protéine : cette extinction de la production a lieu de 12 à 24 heures après la fusion. Quelle est la cause de ce blocage de l'expression d'un gène de différenciation ? A quelle étape de l'expression du gène, ce blocage peut-il se situer : au moment de la transcription du gène sous forme d'ARN-messager, au moment du transport de l'ARN-messager dans le cytoplasme, ou au moment de la traduction de cet ARN en protéine (voir p. 10) ? Les résultats d'autres expériences suggèrent que le blocage s'effectuerait au niveau de la transcription du gène mais ceci reste à démontrer. L'extinction de l'expression de gènes de différenciation dans les cellules hybrides indique que les fibroblastes parentaux, qui n'expriment pas le gène de différenciation étudié, synthétisent un ou plusieurs éléments qui empêchent l'expression de ce gène. Ceci pourrait correspondre, au moins en partie, au mécanisme « naturel » qui assure, dans une cellule de différenciation donnée, la non-expression de gènes caractéristiques d'une autre différenciation.

Reprise de la production de la protéine de différenciation

Revenons au croisement de cellules d'hépatome de rat avec des fibroblastes de souris. L'extinction de la production d'albumine est complète pendant dix à quatorze jours. Pendant ce temps, les hétérocaryons ont disparu et les jeunes cellules hybrides ont proliféré activement, chacune formant une colonie, dont aucune cellule ne synthétise de l'albumine. Par la suite on commence à voir, au sein de ces colonies, quelques cellules où le test immunocytochimique révèle la présence d'albumine ! Ceci se passe presque deux semaines après la fusion, quand les colonies contiennent cent à mille cellules. Avec le temps, le nombre de cellules actives dans la synthèse d'albumine augmente, et après trois semaines, certaines colonies sont composées uniquement de cellules contenant de l'albumine. Cette extinction, transitoire, peut être comparée à la réexpression d'une fonction préalablement éteinte que l'on observe lors de l'élimination de chromosomes dans les cellules hybrides (ségrégation chromosomique), ou bien à des situations où le parent « différencié » possède un lot de chromosomes beaucoup plus important que l'autre, cet effet de dosage génique empêchant l'extinction de la fonction différenciée.

La réexpression de la production d'albumine dans les jeunes hybrides étudiés correspond, dans la plupart des cas, à des effets de dosage génique, car le parent hépatome possède un nombre très élevé de chromosomes (plus du double du nombre diploïde). Néanmoins, même dans ce cas, il y a extinction transitoire.

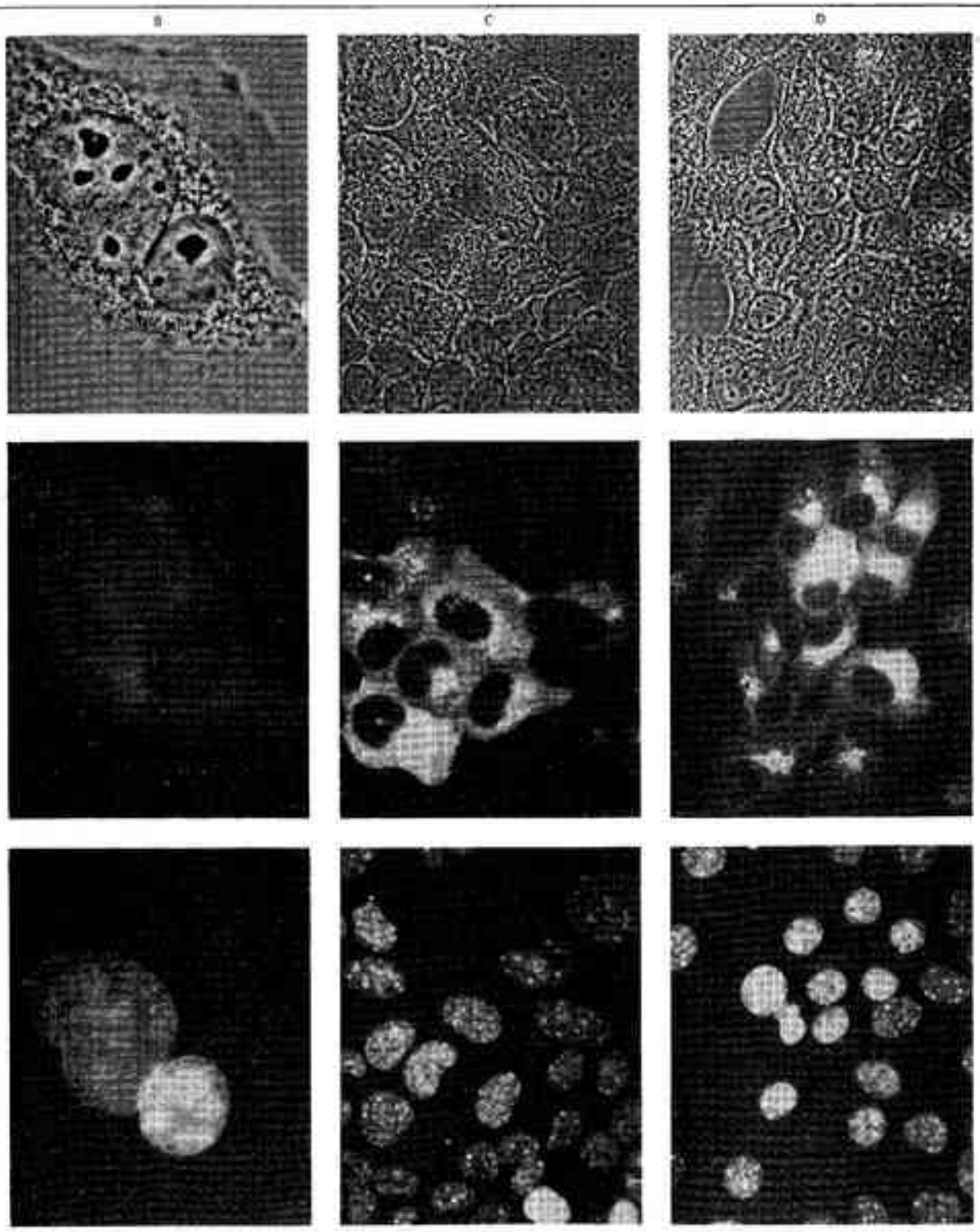
Maintenant que nous avons en main des cellules hybrides qui expriment un gène de différenciation, se pose la question suivante : quels gènes sont actifs, ceux du parent hépatome (rat) ou ceux des fibroblastes (souris) ?... Rappelons qu'il est connu que toute cellule contient tous les gènes nécessaires pour former un organisme entier, mais que la plupart de ceux-ci sont silencieux (non exprimés). Pour l'albumine, il est facile de répondre à la question, car il est possible de préparer des antisérums qui réagissent uniquement avec l'albumine de rat ou avec l'albumine de souris. Nous avons utilisé ces antisérums spécifiques pour examiner des cellules hybrides, ce qui nous a permis de constater que ces cellules synthétisent non seulement l'albumine de rat, mais aussi l'albumine de souris (fig. 2). Il est donc clair qu'un gène de différenciation silencieux peut être activé.

J'ai décrit cette expérience, car elle illustre l'ensemble des interactions qui affectent l'expression de gènes de différenciation lorsqu'on croise deux cellules de différenciation distincte. Il n'est pas possible de détailler ici toutes les expériences qui ont permis de mettre en évidence ces phénomènes et de tirer des conclusions plus précises concernant les conditions expérimentales qui favorisent l'extinction, la réexpression, l'activation et même la co-expression (cette dernière étant la condition permettant de fabriquer les hybridomes) (p. 35). Cette illustration suffit néanmoins pour montrer qu'il est possible, par hybridation de cellules somatiques, de modifier expérimentalement l'expression de gènes de différenciation soit pour empêcher leur expression, soit pour les activer.

Maintenant, on peut se demander dans quelle mesure cette voie d'expérimentation a avancé notre compréhension de la régulation de l'expression de gènes de différenciation, et quelles sont les perspectives pour l'expérimentation future.

Fig. 2 – Modification de l'expression d'un gène de différenciation dans les hétérocaryons et hybrides provenant de la fusion de cellules d'hépatome de rat et de fibroblastes de souris. La technique d'immunofluorescence indirecte permet de suivre dans les cellules individuelles la production d'albumine, une protéine de différenciation. En haut (1), la morphologie des cellules (cliché en microscopie à

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf



contraste de phase). – Au milieu (2), marquage de l'albumine par un réactif fluorescent (cliché au microscope à fluorescence). Les cellules sont fixées sur des lamelles et rendues perméables par l'action du méthanol. Elles sont ensuite traitées avec des anticorps de lapin qui réagissent avec l'albumine de rat. Puis on utilise des anticorps de chèvre, marqués à la fluoresceïne qui se fixent sur les anticorps de lapin, eux mêmes fixés sur l'albumine de rat. – En bas (3), coloration du noyau par un fluorochrome (Hoescht 33 258) qui révèle l'ADN. Les régions où l'ADN se trouve très condensé se présentent comme des taches très brillantes, plus importantes chez la souris que chez le rat (cliché au microscope à fluorescence).

A. Hétérocaryon quelques heures après la fusion ; il contient deux noyaux de souris et un de rat ; l'albumine est présente. – B. Hétérocaryon qui ne contient qu'un noyau de chaque type ; il y a extinction de la production d'albumine. – C. Colonie hybride ; une fraction des cellules synthétise l'albumine de rat (réexpression). – D. Centre d'une colonie hybride dont certaines cellules sont engagées dans la synthèse de l'albumine de souris (activation).

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Facteurs diffusibles et mémoire des cellules différenciées

Premièrement, nous avons vu que l'expression des gènes de différenciation semble être soumise à une régulation par des facteurs diffusibles, régulation dénommée *trans*. En l'absence d'expériences pouvant le démontrer, il n'aurait pas été possible de faire cette prédiction, car on aurait pu également imaginer que l'expression de ces gènes serait amorcée au cours de l'embryogenèse, et se maintiendrait ensuite de façon autonome. Dans ce cas, ce n'est pas la présence ou l'absence du produit d'un autre gène, situé en général sur un autre chromosome, qui peut déterminer qu'un gène soit ou ne soit pas exprimé.

Deuxièmement, les résultats obtenus par l'étude de cellules hybrides formées par la fusion de cellules de différenciation distincte ont indiqué que les cellules différenciées possèdent une mémoire de leur différenciation. Ceci est démontré par deux types d'observation. D'abord le fait qu'une fonction préalablement éteinte puisse être réexprimée, démontre qu'il ne suffit pas d'interrompre l'expression d'un gène pour qu'il reste silencieux pour toujours. Ensuite, bien qu'il soit possible d'activer l'expression d'un gène caractéristique d'un autre type de différenciation, la potentialité d'exprimer les gènes de la différenciation originelle reste (fig. 3). Cette potentialité de restauration de la différenciation de départ n'est pas modifiée par l'hybridation de cellules de différenciation distincte, cet aspect de la différenciation n'est donc pas soumis à un contrôle de type *trans*.

L'utilité de tels hybrides

Pour aller plus loin dans notre compréhension des mécanismes génétiques responsables de l'expression de la différenciation cellulaire, il faut passer maintenant à des études au niveau moléculaire. En fait, l'analyse génétique sert d'une part à mettre en évidence les types de régulation touchant l'expression de gènes, d'autre part, à préparer un matériel expérimental où l'on aura la possibilité de tester le rôle fonctionnel d'un produit de gène. En ce qui concerne les hybrides somatiques, nous avons vu qu'il est maintenant possible pour l'expérimentateur de fabriquer des cellules hybrides où l'expression d'un gène de différenciation est empêchée (extinction) ou activée (activation). Il est désormais possible d'examiner en détail les changements au niveau moléculaire qui sont associés à l'expression ou à la non-expression d'un gène de différenciation. De plus, le moment est venu d'essayer d'identifier et de purifier les facteurs responsables de ces changements dans l'expression des gènes, et ceci fait, de chercher l'existence de ces facteurs dans divers types cellulaires au cours du développement pour préciser leur rôle dans le processus de différenciation des cellules normales.

En ce qui concerne les problèmes médicaux, cette voie d'expérimentation n'offre pas beaucoup d'applications immédiates. Une possibilité serait d'utiliser l'hybridation cellulaire pour déceler le défaut responsable de certaines maladies de nature héréditaire où l'expression d'un gène de différenciation n'a pas lieu, comme c'est le cas pour la phénylcétonurie, où un enzyme hépatique est absent. Pourquoi ce gène n'est-il pas exprimé chez les malades ? Est-ce dû à une mutation dans le gène codant pour cette enzyme, ou à une mutation dans un gène nécessaire à son expression ? Si la deuxième explication est exacte, l'hybridation des cellules d'un malade avec des cellules de rongeur qui expriment cet enzyme devrait aboutir à l'activation de l'expression du gène silencieux. Cette approche a été utilisée récemment avec succès par le Dr. Gluecksohn-Waelsch aux Etats-Unis, pour mieux préciser la nature d'une mutation qui, chez la souris, affecte l'expression de plusieurs enzymes hépatiques. Enfin, comprendre comment est contrôlée l'expression de gènes de différenciation est d'une importance certaine pour mieux comprendre les défauts de régulation qui aboutissent au phénotype anormal des cellules malignes.

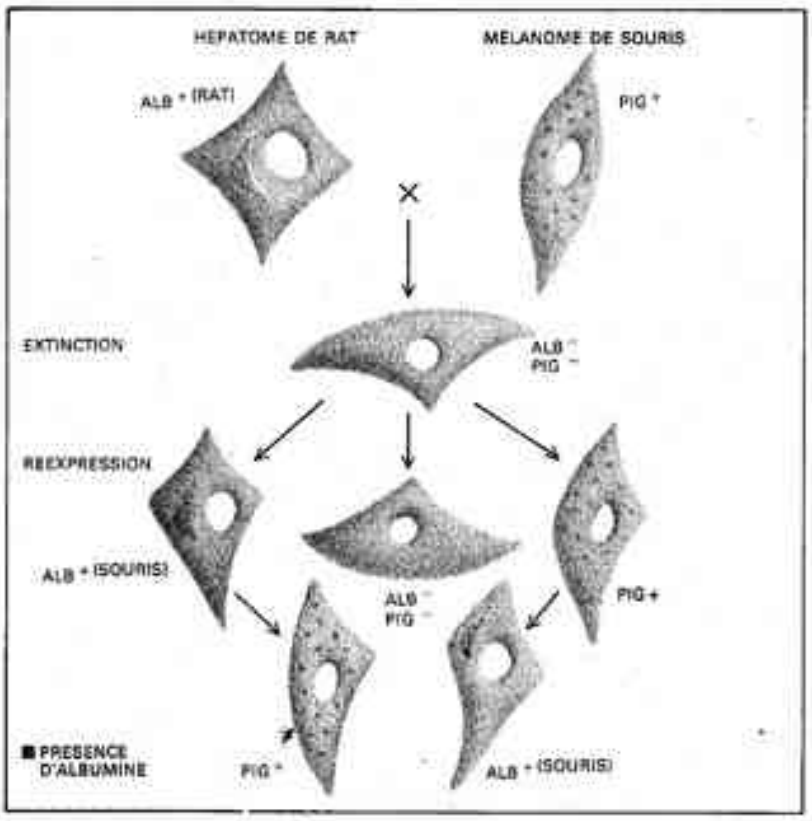


Fig. 3 – Extinction, réexpression et mémoire de la différenciation. – Cette expérience (effectuée par Catherine Fougère-Deschatrette) montre qu'il est possible d'activer l'expression d'un gène de différenciation (celui codant pour l'albumine de souris) sans perdre la mémoire de la différenciation originale (correspondant à la synthèse du pigment mélanique). Des cellules hybrides entre un hépatome de rat et un mélanome de souris gardent la potentialité de réexprimer les deux différenciations parentales, et ceci de façon séquentielle.

BIBLIOGRAPHIE

B. Ephrussi et Mary C. Weiss, « Hybrid somatic cells », *Scientific American* 220, p. 26-35 (1969).
B. Ephrussi, *Hybridization of somatic cells*. Princeton university press, Princeton, New Jersey (1972).
Catherine Fougère and Mary C. Weiss, « Phenotypic exclusion in mouse melanoma – rat hepatoma hybrid cells : pigment and albumin production are not reexpressed simultaneously », *Cell* 15, p. 843-854 (1978).
Maryvonne Mevel-Ninio and Mary C. Weiss, « Immunofluorescence analysis of the time course of extinction, reexpression and activation of albumin production in rat hepatoma – mouse fibroblast heterokaryons and hybrids », *Journal of cell biology* (sous presse).

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

La cartographie des gènes humains

Disposés les uns à la suite des autres sur les chromosomes, les gènes sont transmis à la descendance plus ou moins indépendamment les uns des autres. Les propriétés caractéristiques des hybrides cellulaires de type homme x souris, les techniques de génie génétique sont à la base des méthodes actuelles de cartographie des gènes.

Marc FELLOUS

Quarante-six chromosomes pour l'espèce humaine dont quarante-quatre sous forme de paires, des dizaines de milliers de gènes différents, trois mille caractères biologiques et marqueurs génétiques dont la transmission héréditaire est bien établie et les variations individuelles aisément repérables, telles sont les données de la cartographie génétique. Avec un enjeu important : la connaissance de la transmission des maladies héréditaires, et leur détection précoce.

En 1963, le congrès international de génétique ne rendait compte de la localisation que d'un très petit nombre de gènes, à l'exception évidemment des gènes liés au chromosome sexuel (X). Aujourd'hui, parmi les trois mille marqueurs génétiques répertoriés, sanguins ou tissulaires, deux cents gènes sont localisés, aussi bien sur les deux chromosomes sexuels que sur les autres, et cette carte s'enrichit de un à deux gènes par semaine. Que s'est-il donc passé au cours de ces vingt dernières années ?

En 1967, B. Ephrussi, M. Weiss et H. Green observèrent que les hybrides cellulaires homme x souris (voir p. 35), perdaient progressivement et préférentiellement les chromosomes humains. Cette découverte, adjointe à l'utilisation des techniques nouvelles de repérage des chromosomes (fig. 1) révolutionna l'établissement de la carte chromosomique humaine, auparavant essentiellement basée sur la fréquence des recombinaisons entre gènes au cours de leur transmission héréditaire.

□ Marc Fellous, de l'université de Paris VII, est un spécialiste de l'immunogénétique humaine (unité 93 de l'INSERM, laboratoire d'oncologie et d'immunohématologie du CNRS et de l'université de Paris VII).

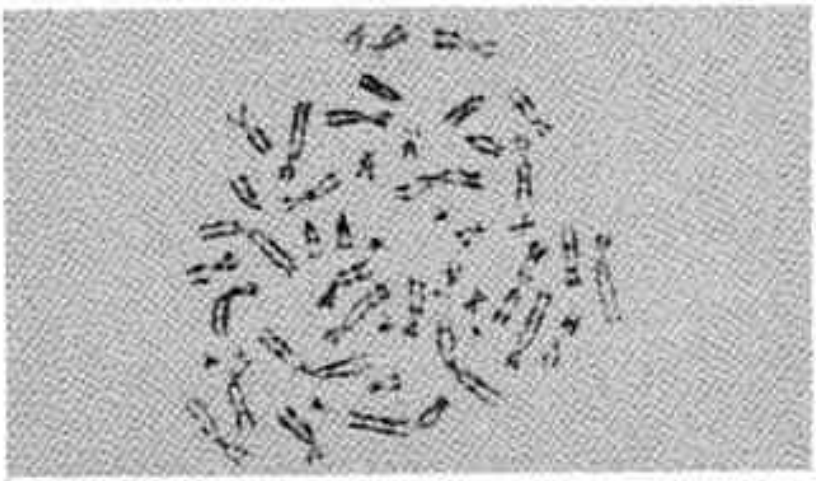


Fig. 1 – Caryotype d'un homme normal (46 XY) obtenu en utilisant la technique des « bandes » GTG (G. bands by trypsin using giemsa). Cette technique permet d'identifier facilement les chromosomes humains. (Cliché R. Berger, maître de recherche au CNRS).

La recherche de liaisons génétiques au sein d'une même famille : une méthode de portée limitée

Quand se déroule la méiose dans les cellules germinales, une ségrégation des chromosomes s'effectue. Les paires de chromosomes parentaux se dissocient, mais en même temps s'effectue un certain nombre d'échanges entre segments chromosomiques homologues ; au cours de ce phénomène, deux gènes peuvent ainsi être transmis ensemble ou au contraire se dissocier donc être transmis indépendamment. On peut ainsi caractériser une fréquence de dissociation des combinaisons parentales, fréquence qui reflète la distance entre ces deux gènes sur le chromosome.

Cette fréquence peut être mesurée en suivant, dans une famille et sa descendance, la transmission de deux caractères. On détermine ainsi le rapport entre la probabilité que deux caractères soient liés et la probabilité que deux caractères soient transmis indépendamment ; ainsi est défini un groupe de liaison génétique (voir encadré).

Cette méthode d'analyse génétique mise au point par N.E. Morton, qui a permis de situer quelques gènes les uns par rapport aux autres, est d'une utilisation limitée. En effet, il faut qu'en premier lieu, il existe plusieurs variantes (au moins deux) du produit du même gène. Il faut ensuite qu'au moins chez un des parents, les deux caractères soient contrôlés chacun par deux variantes différentes du même gène (hétérozygotie pour les deux caractères), et qu'enfin la famille comporte plusieurs enfants (au moins deux).

Même lorsque ces conditions sont réunies, le pouvoir de résolution de la technique est faible et ne permet pas

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

d'étudier des caractères distants de plus de vingt-cinq unités de recombinaison génétique (voir encadré).

Des cellules homme x souris ou homme x hamster pour localiser un gène sur un chromosome

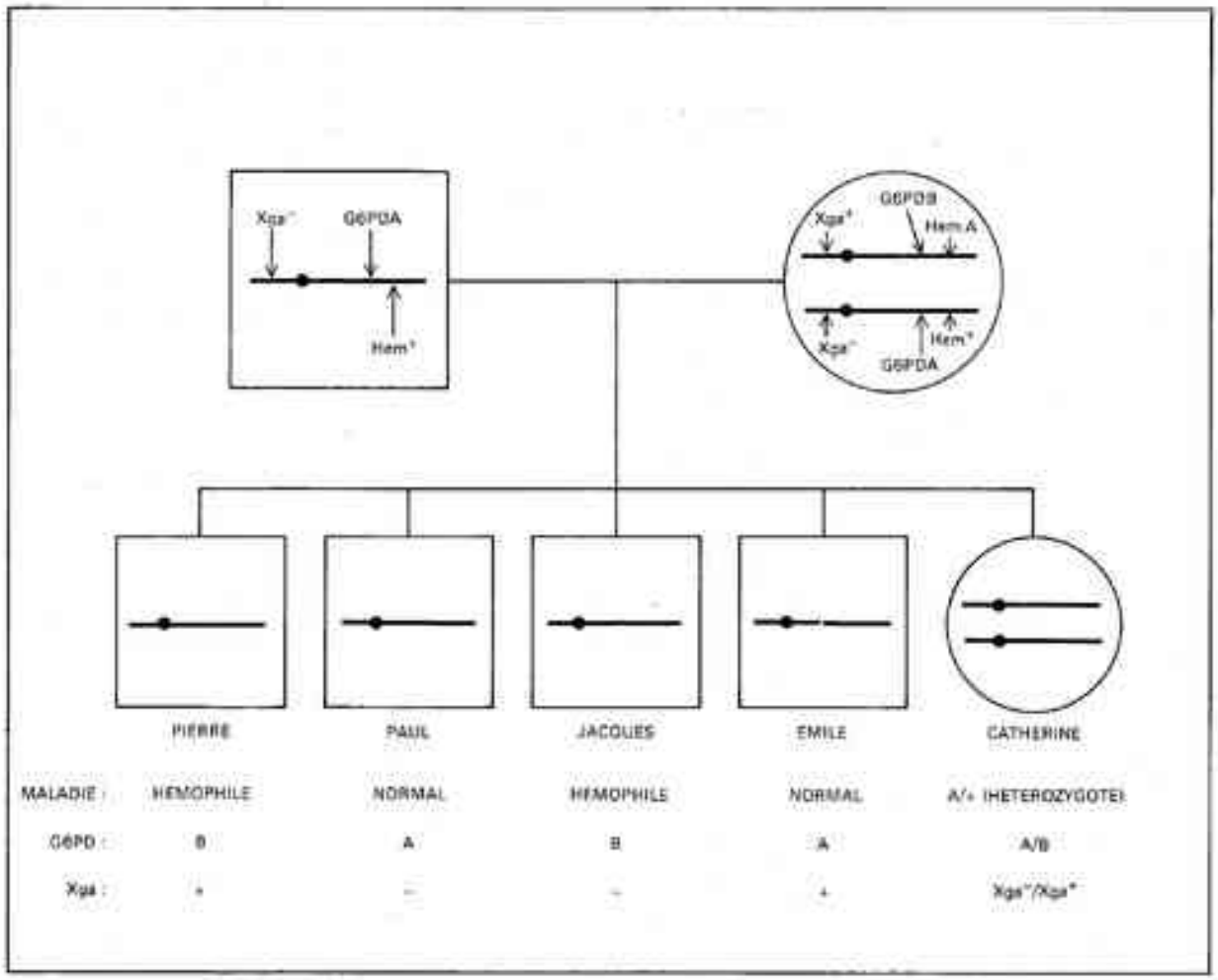
Cette méthode est utilisée depuis une dizaine d'années : elle consiste à faire fusionner des cellules non sexuelles provenant de tissu humain d'une part, de tissu de souris ou d'hamster d'autre part. Les cellules hybrides obtenues contiennent les chromosomes des deux espèces. Mais leur patrimoine génétique n'est pas stable : au bout d'un certain nombre de divisions de la cellule, on observe une perte préférentielle des chromosomes humains, qui s'effectue au hasard. On peut ainsi individualiser plusieurs lignées cellulaires possédant des nombres différents de chromosomes humains et y rechercher la présence de marqueurs génétiques (soit des isoenzymes : c'est-à-dire des enzymes possédant plusieurs formes, soit des antigènes) (fig. 2).

On peut ainsi attribuer un gène à un chromosome et même, dans la mesure ou des gènes ont tendance ou non à être transmis ensemble, à localiser ces différents gènes les uns par rapport aux autres sur le chromosome.

Par rapport à la technique précédemment décrite, l'hybridation cellulaire présente l'avantage de pouvoir être utilisée sur les cellules d'un seul individu en dehors de tout contexte familial, et d'établir des groupes de liaisons – caractérisant les gènes transmis ensemble – même si ces gènes sont très éloignés l'un de l'autre.

Il faut pourtant signaler les limites de cette méthode :

- seuls peuvent être repérés les marqueurs exprimés dans les cellules en culture ;
- les marqueurs humains doivent être facilement distingués des marqueurs correspondants de la souris ou du hamster ;
- des remaniements de chromosomes ne sont pas exceptionnels dans les cellules en culture et compliquent l'analyse.



UN EXEMPLE DE RECOMBINAISON GENETIQUE LIEE AU CHROMOSOME SEXUEL X

Suivons la transmission d'un groupe sanguin Xga (deux variantes : Xga⁻ et Xga⁺), d'un isoenzyme : G6PD (deux variantes : G6PD A et G6PD B) et du facteur hémophilique Hem (deux variantes : Hem A qui entraîne l'hémophilie, et Hem +). La mère, hétérozygote pour tous les caractères, transmet la maladie, le père n'est pas malade. Catherine, hétérozygote pour les caractères considérés, n'est pas prise en compte dans l'analyse ; parmi les enfants mâles, Pierre et Paul ont reçu les chromosomes maternels intacts, Pierre est hémophile, Paul ne l'est pas. Jacques et Emile, par contre ont des chromosomes recombinés, pour la maladie et Xg d'une part, pour Xg et G6PD d'autre part. Donc hémophilie et Xg, G6PD et Xg sont indépendants génétiquement, bien que portés par le même chromosome ; par contre, hémophilie et G6PD sont liés génétiquement, ils appartiennent au même groupe de liaison génétique.

Par ailleurs, une étude sur un grand nombre de familles démontre qu'il y a 50 % de recombinaison entre hémophilie (ou G6PD) et Xg qui sont des marqueurs indépendants génétiquement ; elle démontre également qu'il y a 5 % de recombinaison entre hémophilie et G6PD. Hémophilie et G6PD sont liés génétiquement : on dit que ces marqueurs sont distants de cinq unités de recombinaison.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

Des anomalies dans la structure des chromosomes permettent une localisation plus fine

Par le type d'analyse que nous venons de décrire, on obtient une localisation assez grossière des gènes sur le chromosome et des gènes les uns par rapport aux autres. Mais un repérage plus fin a pu être quelquefois effectué. Il s'agit de cas où la cellule parentale humaine porte une anomalie chromosomique, qu'elle soit due à une simple cassure provoquant la perte d'un fragment : c'est une délétion, ou qu'elle soit due à une double cassure, sur deux chromosomes différents, suivie d'un recollement après échange des fragments rompus : c'est une translocation.

Ces anomalies que l'on peut déceler au microscope optique, provoquent des modifications des liaisons entre gènes : par exemple, si le « petit bras » du chromosome 6 est « transloqué » sur le chromosome 2, tous les marqueurs du petit bras du chromosome 6 seront associés avec les marqueurs du chromosome 2.

Cette stratégie a été largement utilisée pour la cartographie fine de nombreux chromosomes (fig. 3), en particulier pour les chromosomes 1, 6 et X.

Cependant, bien que cette méthode se soit avérée fructueuse, la plus petite portion de chromosome détectable au microscope optique correspond au moins à plusieurs centaines de gènes. D'autres méthodes d'analyse étaient donc nécessaires pour des études de localisation encore plus fine.

Des transferts génétiques limités adaptés à l'hybridation cellulaire

Récemment, de nouvelles méthodes ont été développées : un minimum de matériel génétique humain est transféré à la cellule réceptrice de souris.

La première de ces méthodes utilise des microcellules, c'est-à-dire des chromosomes humains isolés, entourés de membrane nucléaire (fig. 4). Les hybrides cellulaires obtenus à partir de ces microcellules humaines ne comportent donc qu'un seul chromosome humain. Mise au point en 1974 par T. Ege et N.R. Ringertz, cette méthode devrait permettre de fabriquer un échantillonnage étendu de cellules hybrides ne comportant qu'un seul exemplaire de chacun des quarante-six chromosomes humains. L'utilisation de ce type d'hybrides, non seulement facilitera largement l'analyse des liaisons entre gènes, mais permettra également de mieux étudier des problèmes aussi complexes que l'intégration de génomes viraux dans l'ADN chromosomique humain ou certains problèmes de génétique de la différenciation cellulaire.

Il a aussi été possible d'incuber des chromosomes humains isolés avec des cellules de souris déficiente en un enzyme particulier. Dite des « transgenotes », cette technique, décrite par Mc W.O. Bride et H.L. Ozer en 1973, a permis d'intégrer, dans une cellule de souris de type précédent, le gène humain responsable de la synthèse du même enzyme que celui dont la cellule de souris est dépourvue (thymidine kinase par exemple) avec une fréquence de 10^{-6} à 10^{-7}. Utilisant cette technique pour étudier les liaisons entre gènes, K.X. Willecke a observé que dans 20 % des cas où le gène de la thymidine kinase était transféré à la cellule de souris, le gène d'un autre enzyme, la galactokinase, l'était également, et évalue la distance entre ces deux gènes à 0,1 % du génome humain total sous forme haploïde (c'est-à-dire avec une seule garniture chromosomique).

L'hybridation de cellules humaines et la restauration de fonctions déficientes

Il a été possible d'obtenir des hybrides et des hétérocaryons (des cellules où les deux noyaux coexistent) entre cellules humaines provenant d'individus différents.

Si l'on hybride deux génomes porteurs de mutations sur deux gènes différents, mais qui contrôlent le même ca-

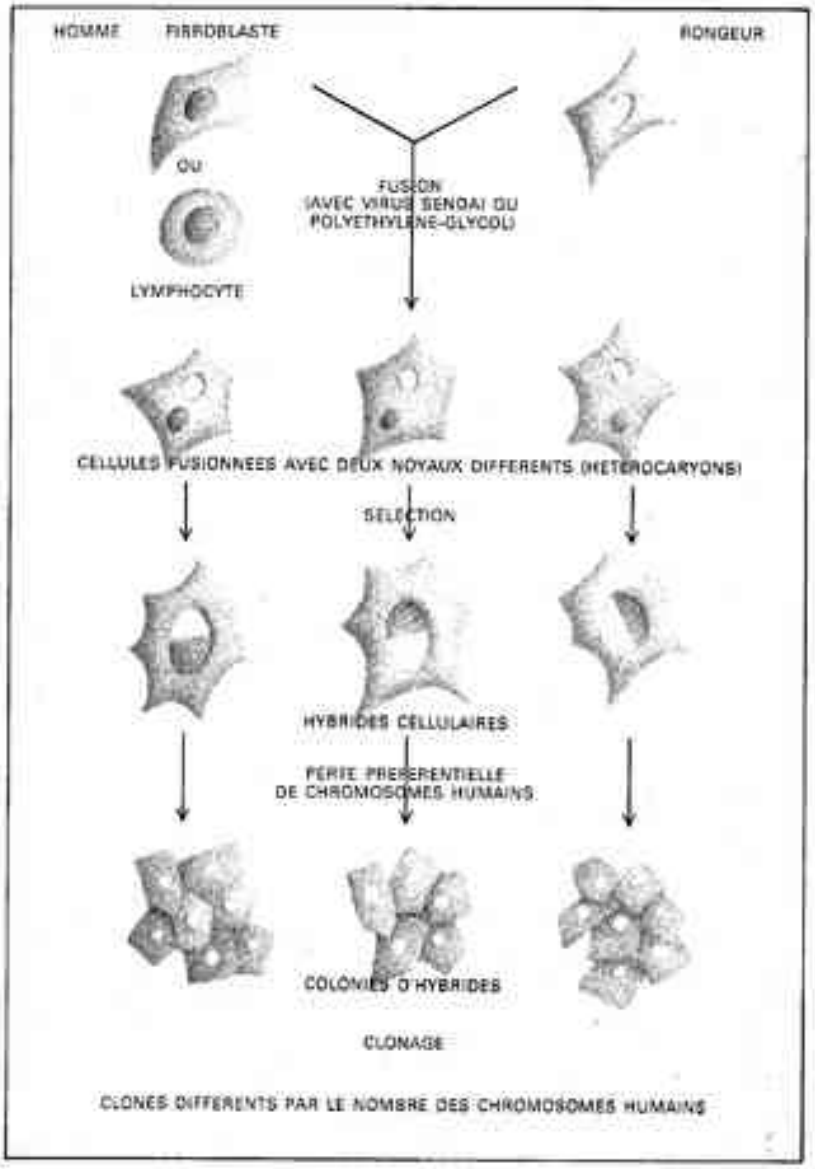


Fig. 2 – Préparation de cellules hybrides homme x rongeur, en vue de la cartographie génétique.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

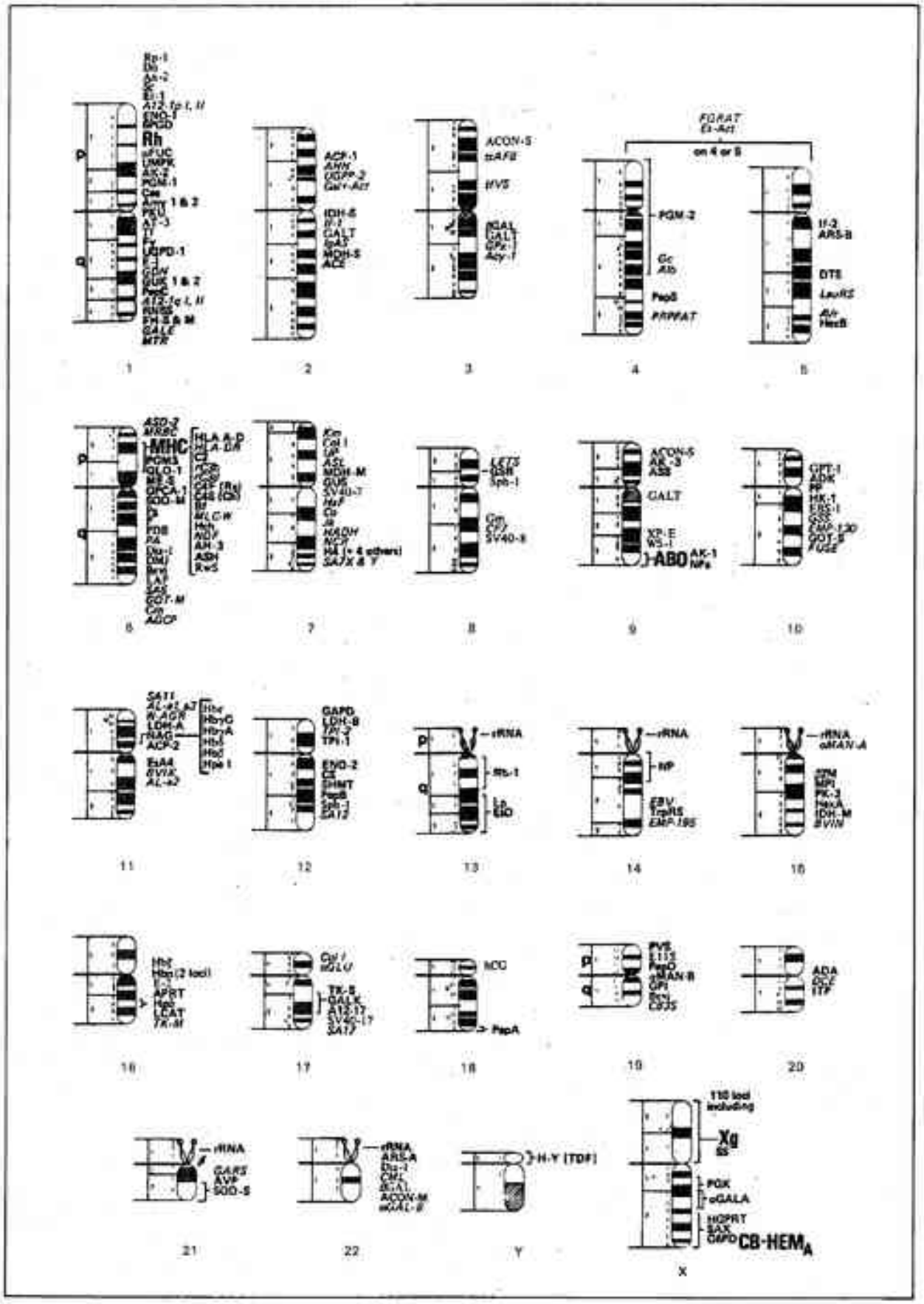


Fig. 3 – Carte génétique humaine, d'après la dernière version éditée par le docteur V.A. Mc Kusick au 15 juin 1979. Sur cette carte figurent notamment les gènes correspondants aux groupes sanguins (ABO, HLA), à des enzymes (PGM), à l'hémoglobine α et β, à l'ARN ribosomal.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

ractère, ce caractère sera corrigé dans la cellule hybride, la fonction déficiente d'un des génomes étant complémentée par l'autre génome, et réciproquement ; au contraire, si les deux cellules parentales sont porteuses d'une mutation sur le même gène, la cellule hybride sera déficiente pour le caractère. De telles expériences trouvent une application dans l'étude génétique des maladies héréditaires, comme la galactosémie, la maladie de Tay-Sachs, ou le *Xeroderma pigmentosum*, où il est important, pour connaître le risque de transmission de la maladie, de savoir où se trouve la lésion génétique.

L'utilisation directe de gènes purifiés

La possibilité d'isoler puis de déterminer la structure de gènes humains, comme ceux de la globine – qui constitue la partie protéique de l'hémoglobine –, des immuglobulines, de l'insuline, des interférons ou de l'hormone de croissance, a évidemment ouvert une voie très fructueuse pour l'étude de l'organisation génétique et de la fonction normale ou anormale de ces gènes.

Il a par exemple pu être démontré que des délétions ou des mutations pourraient être responsables de la thalassémie qui est une maladie due à une modification structurale de la molécule d'hémoglobine.

Des gènes clonés peuvent être utilisés en tant que sonde, car ils peuvent s'apparier avec des portions d'ADN de séquence complémentaire (voir p. 12). On peut ainsi apparier *in situ* sur des chromosomes, au cours de la division cellulaire, des acides nucléiques radioactifs « sondes » et repérer par autoradiographie le site d'appariement, c'est-à-dire l'emplacement du gène sur le chromosome. De cette manière, on a pu localiser un des gènes de l'hémoglobine sur le grand bras du chromosome 2.

On peut également apparier ces sondes spécifiques avec des hybrides cellulaires homme x souris et détecter, dans les différents hybrides obtenus après perte préférentielle des chromosomes humains, la présence de gènes humains particuliers. Ainsi l'insuline a été localisée sur le chromosome 11, l'interféron sur les chromosomes 2 et 5, l'hormone de croissance sur le chromosome 17. Enfin, on peut apparier ces sondes sur des chromosomes qu'on a pu isoler grâce au « cell-sorter » (voir encadré). C'est ainsi qu'on a pu localiser les différents gènes contrôlant la synthèse des différentes chaînes protéiques de la molécule d'hémoglobine : gène α sur le chromosome 16, gènes β, γ et δ sur le petit bras du chromosome 11.

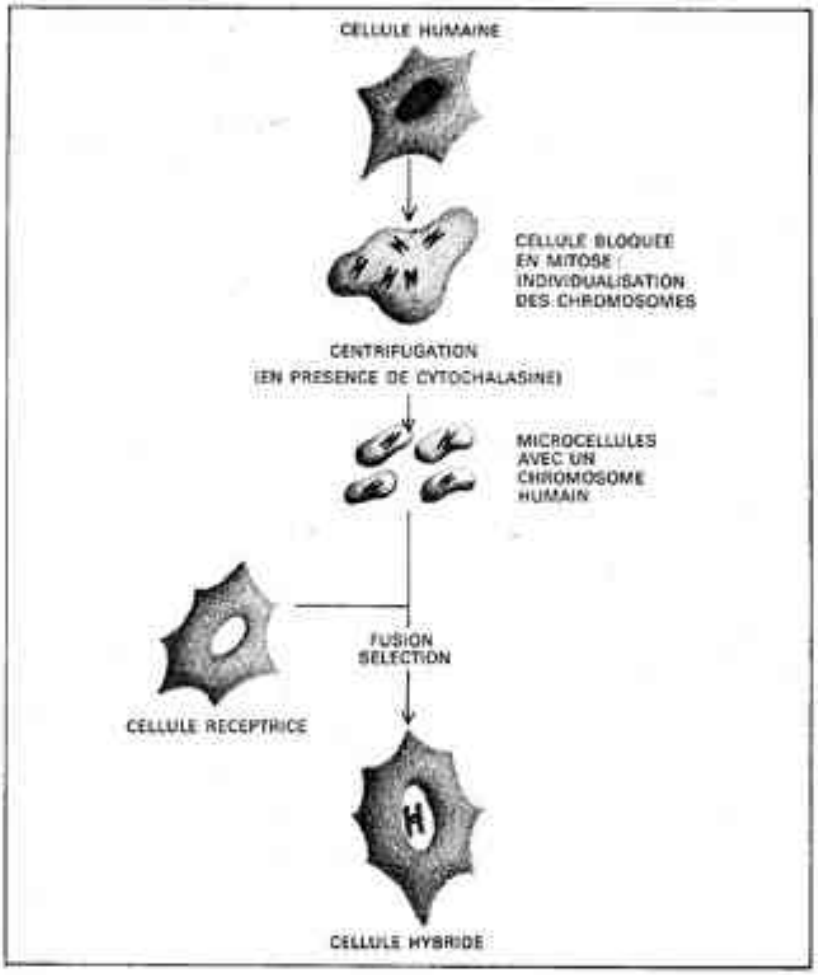


Fig. 4 – Transfert génétique à l'aide de « microcellules ». – Les microcellules contiennent un ou quelques chromosomes. Fusionnées avec des cellules de souris, elles fournissent des hybrides qui ne contiennent qu'un ou que quelques chromosomes.

Les enzymes de restriction et l'analyse des gènes des hémoglobines normales et pathologiques

Les enzymes de restriction sont des enzymes qui coupent l'ADN en des sites spécifiques. Ces outils, qui ont permis l'essor du génie génétique, sont très utiles pour construire des cartes très fines du génome humain.

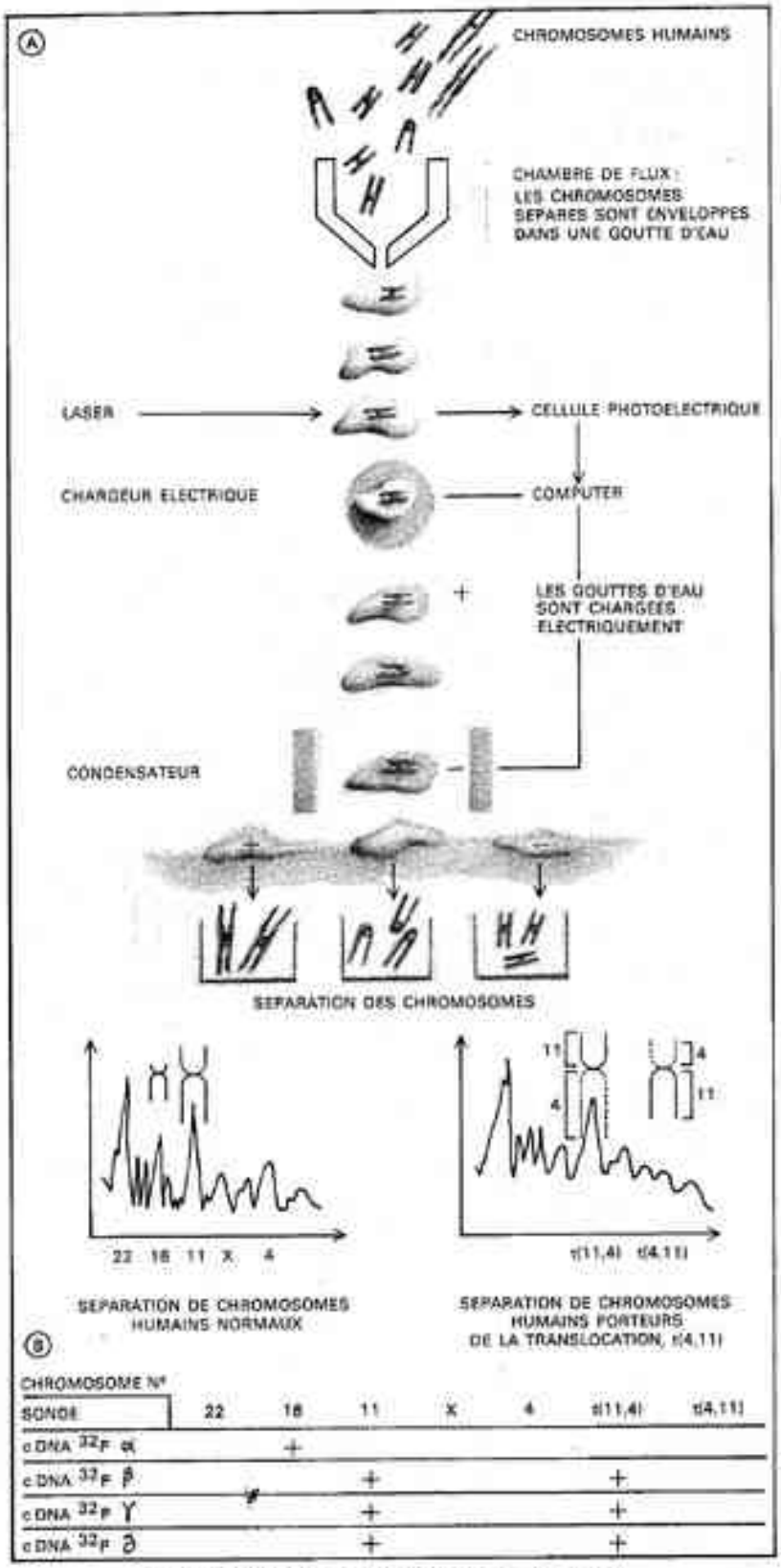
Ainsi a pu être effectuée une analyse des gènes correspondant aux chaînes γ, β et δ de l'hémoglobine, de la distance séparant ces gènes sur le chromosome 11, et des séquences de nucléotides de ces gènes non « traduites » (c'est-à-dire auxquelles ne correspond pas de synthèse de protéine).

Une analyse du gène de la chaîne β de l'hémoglobine, dans le cas de la thalassémie, a été effectuée par Y.W. Kan et A.M. Dozy. Lorsqu'on fractionne l'ADN par un enzyme de restriction, suivant les malades, la portion d'ADN dans laquelle est inclus le gène est plus ou moins grande ; cette longueur est héritée d'une manière mendelienne, et les divers fragments obtenus définissent un nouveau type de marqueur génétique. De plus, le plus grand des fragments obtenus est lié génétiquement avec une mutation du gène β, dite β^S, qui correspond à la thalassémie ; d'où la technique de diagnostic prénatal de cette maladie : on recherche, après digestion du génome par un enzyme de restriction particulier, le fragment « long » ; s'il est présent, le génome est probablement porteur de la mutation correspondant à la thalassémie.

La cartographie génétique et la pathologie humaine

Ces nouvelles méthodes, ainsi que d'autres comme les hybridomes, permettront des progrès dans notre connaissance des gènes. Elles nous of-

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf



CHROMOSOME N° / SONDE	22	18	11	X	4	t(11,4)	t(4,11)
c DNA ^{32}P α		+					
c DNA ^{32}P β			+			+	
c DNA ^{32}P γ			+			+	
c DNA ^{32}P δ			+			+	

LOCALISATION CHROMOSOMIQUE FINE DES GENES α, β, γ ET δ DE L'HEMOGLOBINE

A – Isolement des chromosomes à l'aide du cell-sorter.
B – Hybridation des différents chromosomes purifiés avec les sondes spécifiques des gènes de globines α, β, γ et δ, les ADN ayant été préalablement fragmentés par l'enzyme de restriction EcoRI, et les sondes marquées au phosphore radioactif.

Le gène de la globine α est porté par le chromosome 16 ; les gènes β, γ et δ sont portés par le petit bras du chromosome 11.

frent la possibilité de mieux étudier directement, au niveau du gène et de l'ADN, les mécanismes de l'hérédité chez l'homme normal ainsi que la transmission des maladies d'origine génétique. En effet depuis G. Mendel, le généticien étudie l'hérédité de nombreuses fonctions biologiques souvent complexes par ses manifestations observables qui résultent de l'interaction entre le produit du gène et son environnement. Le généticien de demain aura à sa disposition une banque de nombreux gènes, avec leur séquence complète, leur organisation intrinsèque ou leur localisation sur le chromosome. Cependant, les difficultés apparaîtront quand il faudra combiner les deux approches. Ce n'est qu'à cette seule condition que l'on pourra mieux aborder des problèmes aussi important que :

- le fonctionnement des gènes au cours du développement, de la différenciation cellulaire normale ou au cours du cancer ;
- le mécanisme du vieillissement et son éventuel contrôle génétique ;
- la « dissection » d'ensembles complexes comme le développement de la face qui fait qu'un enfant ressemble à ses parents ou qu'au contraire à l'occasion d'une anomalie génétique se développe un bec de lièvre par exemple ;
- une meilleure définition de l'individualité génétique de l'homme, reliant la biologie avec la structure sociologique environnante.

Déjà les techniques sophistiquées de transfert génétique nous permettent de corriger *in vitro* les défauts au niveau d'une cellule. Mais la biologie de ces transformations n'est pas encore parfaitement éclaircie ; c'est la raison pour laquelle son application en clinique humaine fait encore partie de la science-fiction. Malgré tout, ces possibilités nous encouragent plus que jamais à mieux connaître l'organisation du génome humain.

BIBLIOGRAPHIE

– B. Ephrussi, 1972, *Hybridization of somatic cells*, Princeton university press.
– Human genetics, *Possibilities and realities*. Ciba foundation, symposium 66, new series, 1979.
– Human Gene Mapping 5. Edinburgh conference 1979. *Birth defects*. The national foundation march of dimes.
– Y.W. Kan and A.M. Dozy, *Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β globin structural gene. Relation to sickle mutation*. PNAS n° 11, p. 5 631-5 635, 1978.
– R. Lebo, A. Carrano, K. Schultz, A. Dozy, Y.W. Kan, *Assignments of human β, γ et δ globin gene to the short arm of chromosome 11 by chromosome sorting and DNA restriction enzyme analysis*. PNAS n° 76, p. 5 804-5 808, 1979.
– D. Botstein, R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis, *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism*. American J. Human genetic 32, p. 314-331, 1980.
– U.A. Mc Kusick, 1979, *Mendelian inheritance in man 5 th ed. Baltimore*. The Johns Hopkins university

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

La définition et la reconnaissance du "soi"

La diversité génétique trouve sa manifestation la plus éclatante avec l'expression du système HLA. Quelle est la finalité de ce polymorphisme qui a été révélé à l'occasion de ces agressions parfaitement antinaturelles que sont les greffes ? Gardien de l'intégrité de l'individu, le système HLA est au centre de la défense de l'espèce humaine elle-même.

Jean DAUSSET

Depuis la découverte par Landsteiner en 1900 des groupes sanguins ABO, on sait qu'il existe des différences biologiques qui séparent les hommes en « groupes » selon qu'ils possèdent ou non une des variantes ou allèle d'un même gène. Au niveau de ce gène qui gouverne l'apparition, à la surface des globules rouges, des structures glucidiques du système de groupes sanguins peuvent exister schématiquement trois variantes : A, B ou O. Chaque homme reçoit donc de ses deux parents un de ces caractères ; un individu peut donc être homozygote A (AA), B (BB), O (OO) ou hétérozygote AB, AO, BO, d'où l'existence de six génotypes. En fait, il n'y a que quatre phénotypes ou groupes sanguins puisque le phénotype AA se comporte dans les tests d'agglutination comme AO (et BB comme BO).

Un milliard de combinaisons HLA

Ce rappel très (trop) simple était peut être nécessaire pour faire comprendre facilement l'extrême complexité du système HLA (Histocompatibility Leukocyte, premier système A) qui définit des groupes leucocytaires. On pense actuellement qu'il se compose de quatre et peut-être cinq gènes (ou loci) se trouvant très proches les uns des autres sur le petit bras du chromosome 6. Ces gènes peuvent être classés en deux catégories suivant les molécules pour lesquelles ils codent :

- les loci A, B et C codent, pour les structures de la classe I, des molécules qui se trouvent à la surface de la quasi-totalité des cellules de notre organisme et qui sont donc ubiquitaires ;
- les loci D et DR (qui n'en forment peut-être qu'un) codent, pour les structures de la classe II, des molécules localisées à la surface des cellules immuno-compétentes (lymphocytes B, T activés et monocytes et certaines cellules somatiques).

A ces deux catégories de gènes, il faut en ajouter une troisième (qui ne fait pas officiellement partie du système HLA). Ces gènes (C2, C4S, C4F et Bf) codent pour des composants du complément, une série de molécules intervenant dans la chaîne de réactions qui conduit à la destruction d'une cible où s'est fixé un anticorps. Ce sont les produits de la classe III.

Tous ces gènes sont eux-mêmes extrêmement polymorphes. Au lieu des trois possibilités du système ABO, on compte quinze variantes au locus HLA-A, trente-sept au locus B, huit au locus C, douze au locus HLA-D et dix au locus D. De même C2, C4S, C4F et Bf sont eux-mêmes polymorphes.

Partant des notions actuellement connues, on peut calculer que, rien que par la diversité des gènes du complexe HLA, y compris ceux des facteurs du complément, il y a 84.10^6 phénotypes possibles et 1.10^9 génotypes possibles.

Si maintenant, on songe aux autres systèmes génétiques (groupes de globules rouges, iso-enzymes) qui possèdent aussi des variantes – et en fait une proportion assez grande du génome humain est probablement polymorphe –, on voit qu'il n'y a jamais eu et qu'il n'y aura jamais sur la terre (en dehors des vrais jumeaux) deux hommes génétiquement semblables. Le nombre des combinaisons, en effet, dépasse celui des hommes ayant jamais existé et même celui des atomes de toutes les galaxies connues de l'univers (10^{90}).

Ce qui est vrai pour le complexe HLA, l'est également pour d'autres gènes qui influencent, sans doute, aussi la transplantation : des systèmes mineurs d'histocompatibilité dont on suppose chez l'homme l'existence par analogie avec la souris, chez laquelle, au moins trente systèmes sont déjà démontrés.

Quel avantage biologique attribuer à des gènes polymorphes apparemment neutres...

On touche ainsi du doigt l'infinie diversité de chaque être, son caractère véritablement unique qui lui fait bien mériter le beau nom d'individu.

Et pourtant ne sommes-nous pas confrontés avec l'évidente unicité de l'espèce humaine, malgré cette extrême diversité, car peut-être l'homme est-il l'une des espèces la plus uniforme dans sa structure, sa composition et ses comportements.

Comment peut-on concilier ces deux notions apparemment diamétralement opposées ? Nous en sommes réduits aux hypothèses.

On peut évoquer le simple hasard, autrement dit la neutralité de chacune de ces variantes qui sont apparues d'une façon anarchique, sous l'effet des mutations au cours des siècles. Cette possibilité n'est pas à exclure et elle explique, sans doute, un grand nombre de polymorphismes. Encore faut-il que les modifications que ces mutations entraî-

□ Jean Dausset, prix Nobel de médecine 1980, est professeur au Collège de France, directeur-adjoint du laboratoire d'oncologie et immuno-hématologie (laboratoire mixte CNRS-université de Paris VII) et directeur de l'unité 93 de l'INSERM. Ses recherches en immuno-hématologie l'ont mené à la découverte du système HLA et du rôle de ce système dans le rejet de greffes.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

nent ne soit pas néfastes, autrement dit qu'elles n'aient pas une action négative qui les aurait fait rapidement éliminer. En d'autres termes, ces variantes pourraient n'avoir aucun sens biologique, aucun rôle spécial mais ceci à la condition expresse de leur neutralité métabolique.

On peut, à ce propos, remarquer qu'une molécule aussi essentielle à la vie que l'hémoglobine comporte une partie presque constante d'une espèce à l'autre, et ne peut présenter que d'infimes variations sous peine de ne plus assurer sa fonction vitale de transporteur d'oxygène. Dans cette optique, les variations que nous observons sont celles qui sont acceptables pour le maintien de la vie, tout au moins jusqu'à l'âge de la reproduction. Elles sont neutres, sans impact sur l'adaptation de l'espèce aux variations parfois brutales de l'environnement.

Mais évoquer le hasard est une solution de paresse intellectuelle même si elle correspond, sans doute, dans certains cas à la réalité. Est-il besoin de rappeler qu'apparemment 1/3 seulement de nos quelques 10^6 gènes semble fonctionnel ? Les deux tiers sont des redondances des précédents, redondances exactes ou ayant subi quelques modifications par mutations. On en vient donc à penser que la nature a pourvu chaque être de multiples possibilités qui peuvent à tout moment se révéler utiles, s'il est mis en présence d'une nouvelle situation extérieure, par exemple climatique ou infectieuse. Ainsi, la survie de l'espèce est-elle sinon garantie, tout au moins franchement favorisée grâce à ces gènes dormants, inactifs, mais prêts à assurer la relève des gènes fonctionnels devenus subitement non adaptés.

Un autre exemple permettra de bien illustrer un fait que l'on a souvent tendance à oublier : un gène n'est jamais entièrement bénéfique ou jamais entièrement néfaste en soi. Il est bénéfique dans certaines conditions, néfaste dans d'autres, et c'est la balance entre ces deux forces qui le maintient en un certain pourcentage dans la population. On a récemment découvert que l'une des variantes du gène Duffy (Fy^a), qui n'est qu'un groupe sanguin parmi d'autres, était sans doute le récepteur du *Plasmodium vivax*, l'un des agents du paludisme. Les individus qui le possèdent sont donc susceptibles à cette forme, heureusement la moins grave du paludisme. La maladie sous cette forme relativement bénigne n'empêche pas la reproduction, donc la persistance, du gène délétère dans la population. Ou mieux, ce gène apparemment néfaste a-t-il dans une autre circonstance encore ignorée, un avantage biologique ?

...et au système HLA ?

Le polymorphisme des gènes HLA est tel qu'il est difficile de penser qu'il soit neutre. Nous nous efforcerons dans les lignes qui vont suivre de leur trouver une finalité bien que celle-ci soit encore très hypothétique.

Nous avons vu que le complexe HLA gouvernait au moins trois catégories de produits : les uns ubiquitaires, les autres présents seulement sur certaines cellules spécialisées et enfin certains enzymes (complément). Cet assemblage sur une toute petite portion de notre génome peut paraître dénué de logique. Il n'en est sans doute rien et des liens étroits semblent exister entre ces gènes. On a même pu dire qu'ils agissaient d'une façon synergique, formant ainsi une unité fonctionnelle que l'on a appelée un supergène.

On sait encore peu de choses des fonctions de ces divers gènes mais on peut, grâce aux études faites chez la souris, en tracer un rapide aperçu, bien imparfait et certainement abusivement schématique.

Trois fonctions sont clairement établies :

- fonction de cible des produits des gènes de la classe I ;
- fonction de déclenchement des armes immunitaires des produits de la classe II ;
- fonction d'activation des composants terminaux du complément, en vue d'entraîner la lyse des cibles par les anticorps correspondants.

Toute molécule ubiquitaire modifiée est perçue comme étrangère

Les structures ubiquitaires HLA-A, B et C peuvent être considérées comme des cibles et ceci dans trois cas.

Le premier correspond à une altération même minime de ces molécules par mutation, une erreur fortuite de transcription du message génétique fera qu'elles seront immédiatement considérées comme étrangères et par conséquent éliminées. On conçoit donc que la formule de ces molécules au polymorphisme si grand, puisse représenter la véritable carte d'identité de l'individu. Une molécule mutée devient une auto-cible.

Le deuxième cas, sans doute plus artificiel, est créé par la transplantation d'organe. L'organe greffé porte des molécules différentes dites incompatibles, modifiées au cours des siècles d'évolution et par conséquent reconnues comme étrangères. On les appelle des allo-cibles.

Enfin, le troisième cas serait observé selon des théories récentes non encore totalement vérifiées, lorsque ces molécules ubiquitaires, en antenne à la surface de toutes les cellules, seraient modifiées, altérées par des virus ou par des agents chimiques, non pathogènes. Un complexe serait alors formé entre le virus et les molécules HLA (ou l'une des molécules HLA). Ce complexe serait immédiatement reconnu comme étranger et éliminé, mais il ne peut l'être que si la cellule immunisée et la cellule porteuse d'une structure HLA modifiée appartiennent au même organisme, c'est-à-dire portent des mêmes structures HLA complémentaires (structures HLA actuellement connues et leurs éventuels récepteurs). Mais dans certains cas, l'interaction virus-structure HLA ne se fait probablement pas correctement : la cible n'est pas formée, la cellule infectée n'est donc pas éliminée.

On voit que dans ces trois cas, les molécules HLA subissent de légères altérations (par mutation, par évolution au cours des âges ou par interaction avec un virus). Elles peuvent donc être considérées comme des molécules hautement et facilement modifiables de façon à permettre à l'organisme d'éliminer les cellules qui les portent. Elles apparaissent ainsi comme les gardiens de l'intégrité de l'individu.

Des molécules indispensables à la coopération entre cellules immuno-compétentes

Les structures non ubiquitaires (HLA-D/DR), portées par les différentes sous-populations de cellules immuno-compétentes (chaque type cellulaire porte, probablement comme chez la souris, une structure HLA différente de celle des autres, quoique codée par le même complexe HLA), semblent bien jouer un rôle essentiel aux différentes étapes de la réponse immunitaire. Elles permettent aux monocytes/macrophages, lymphocytes T activateurs ou suppresseurs, lymphocytes B, aux cellules effectives de la réponse humorale (plasmocytes) et aux cellules effectives de la réponse cellulaire (lymphocytes T cytotoxiques), de communiquer entre-eux par contact direct ou par des facteurs solubles.

Dans chaque « message » entre ces cellules, sont inscrites à la fois la spécificité de l'antigène contre lequel l'action du système immunitaire est déclenché et la spécificité du moi. En effet, ce langage ne sera pas compris si

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

les deux cellules, émettrice et réceptrice n'appartiennent pas au même organisme.

Comme on le voit aussi bien pour les produits de la classe I que pour ceux de la classe II, il y a nécessité d'identité entre les cellules qui coopèrent. Sans cette identité au niveau des produits du complexe HLA, la fonction n'est pas accomplie. Quelquefois, les messages ne sont pas transmis par manque d'interaction adéquate entre le corps étranger et la structure HLA portée par les sous-populations de lymphocytes. Ceci entraîne l'absence de réponse immunitaire.

En fait, on ignore encore si c'est la stricte identité des structures HLA à la surface des deux cellules coopérantes qui est la raison de la reconnaissance du soi, ou si, plus probablement il existe une clef et une serrure, autrement dit un phénomène de complémentarité entre deux molécules. Pour le moment, il faut bien souligner que nous ne connaissons qu'un de ces deux éléments.

Ceci n'enlève rien au phénomène qui est que la reconnaissance du soi se fait essentiellement grâce aux produits du complexe HLA dont ce pourrait être la finalité.

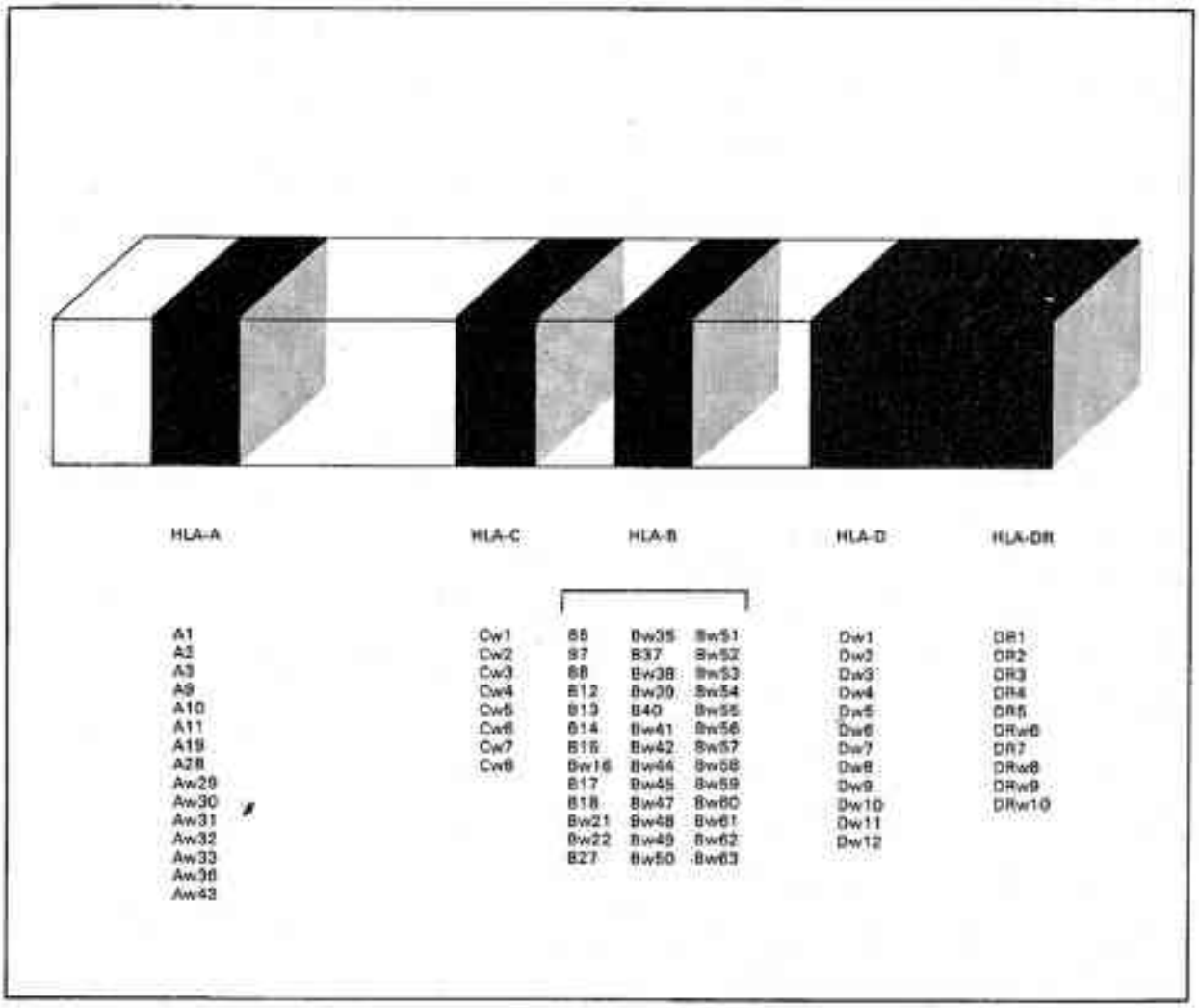
L'existence dans le complexe HLA des gènes polymorphes de certains facteurs du complément donne à celui-ci une nouvelle dimension et accentue encore son rôle dans la défense immunitaire.

Des gènes de susceptibilité à certaines maladies sont localisés dans le complexe HLA

Ces diverses considérations permettent d'essayer de comprendre l'influence du système HLA en transplantation ainsi que les fréquentes associations entre HLA et certaines maladies.

En effet, chaque formule HLA, c'est-à-dire chaque combinaison d'allèles HLA sur les chromosomes homologues 6 a, sans doute, ses défauts et ses qualités propres. Chaque séquence est une véritable petite usine immunologique avec ses insuffisances et ses capacités. Certaines séquences, comme par exemple (A1, B8, BfS, Dw3, DR3), entraînent la possibilité d'une forte réponse humorale. Celle-ci protège certainement contre de nombreux agents extra-cellulaires contre lesquels les anticorps sont capables d'agir. Mais l'envers de la médaille est que les individus qui possèdent cette même séquence développent plus souvent que d'autres des réactions auto-immunes et par conséquent toute une série de maladies diverses telles que la myasthénie grave, la maladie d'Addison ou la maladie de Basedow ou même le diabète juvénile insulino-dépendant.

A l'inverse, une autre formule (A3, B7, Dw2, DRw2) protège contre le diabète mais entraîne une susceptibilité inquiétante à la sclérose en plaques. La réponse immune humorale est faible mais la fragilité qui en découle est cer-



Le polymorphisme du complexe HLA. – Le complexe HLA se trouve sur le petit bras du chromosome 6. – Les différents gènes qui le composent (A, B, C, D, DR) présentent plusieurs variantes suivant les individus.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf

tainement compensée par un avantage sélectif encore ignoré.

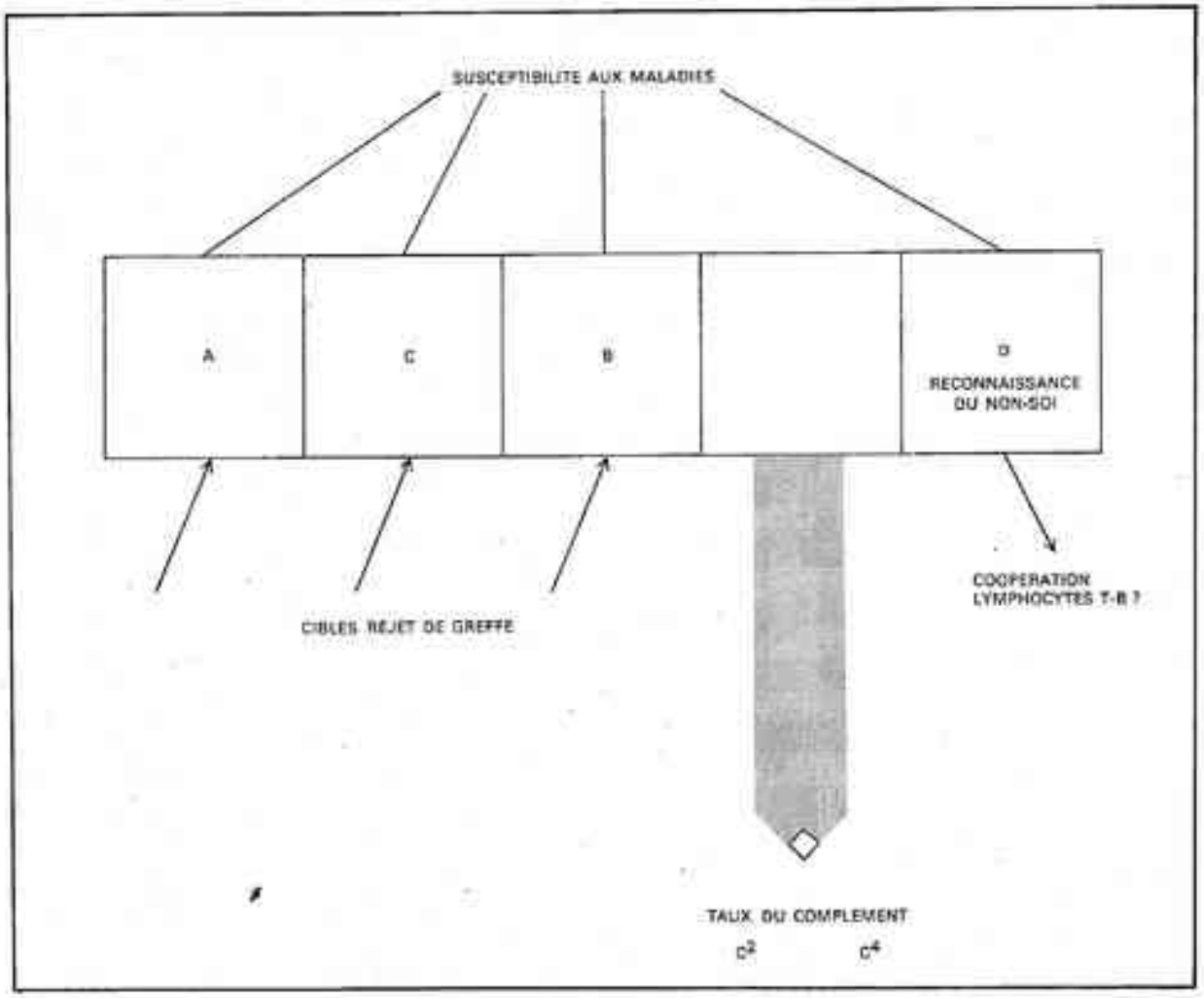
Ces caractères particuliers de telle ou telle combinaison peuvent être dus aux interactions synergiques ou aux complémentations entre allèles de différents loci, comme cela vient d'être démontré chez la souris, mais, aussi au fait que tel produit de la classe I sera mieux capable qu'un autre de se complexer avec un certain virus, ou encore que tel produit de la classe II sera mieux capable de transmettre l'information, d'une population de cellules à une autre, concernant un certain antigène, ou encore qu'il existe le facteur du complément adéquat pour aboutir à une réponse immunitaire effective. On comprend ainsi qu'au cours des épidémies du passé qui atteignaient plus facilement que maintenant des groupements humains isolés, donc relativement consanguins, l'agent infectieux pouvait éliminer un grand nombre d'individus. Mais, grâce au polymorphisme, quelques-uns étaient épargnés. Ainsi, l'espèce s'est perpétuée.

En conclusion, le complexe HLA est au centre de la défense, non seulement de l'individu mais de l'espèce elle-même. Grâce à l'extrême variété des formules individuelles, chaque homme a une chance différente de survie. Chaque individu possède à la surface de ses cellules des structures glycoprotéiques qui permettent une auto-reconnaissance permanente entrainant la cohésion, l'intégrité de chacun. La destruction par des cellules tueuses n'est possible que si la cible porte bien une marque individuelle commune à la cellule cible et à la cellule effectrice. De même, le message qui doit aboutir à l'élimination d'un antigène étranger ne sera transmis de cellules à cellules que s'il existe entre-elles, une marque individuelle commune, en somme un mot de passe.

On reste confondu devant ces mécanismes subtils, que nous ne faisons d'ailleurs encore qu'entrevoir car ils sont, sans doute, encore plus généraux que nous ne le pensons ; mécanismes qui permettent à des cellules aussi spécialisées que des cellules nerveuses ou hépatiques par exemple de coopérer pour le fonctionnement harmonieux des millions de cellules des êtres pluricellulaires.

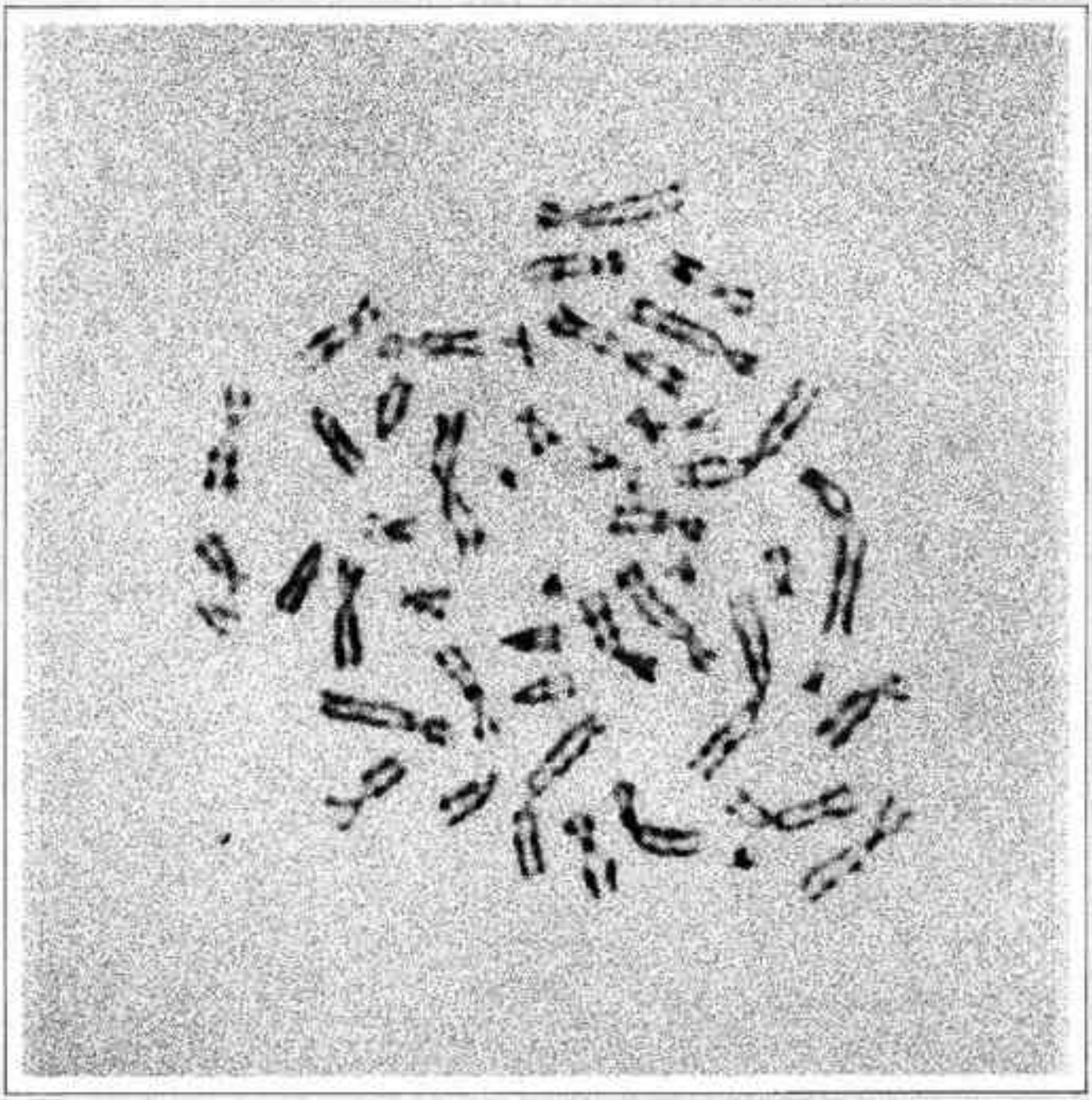
BIBLIOGRAPHIE

J. Dausset et L. Cerna, « Is the MHC a general self-recognition system playing a major unifying role in the organism ? », *Human Immunology*, 1980, 1, 5-17.
G. Snell, J. Dausset, S. Nathenson, *Histocompatibility*, un volume, Academic Press, 1976.
B. Benacerraf, « Genetic control of the specificity of T lymphocytes and their regulatory products », in *Immunology 1980*, édité par J. Dausset et M. Fougereau, pp. 419-431, Academic Press, 1980.



Rôle du complexe génique HLA. – Segment du chromosome 6 portant les gènes du complexe HLA. On distingue : les gènes de la classe I (A, B, C) qui codent pour des produits ubiquitaires à la surface de toutes (ou quasi toutes) les cellules de l'organisme et qui semble-t-il servent de cibles aussi bien pour le rejet des greffes que pour l'élimination d'une cellule infectée, par exemple, par un virus qui a une interaction avec ces produits ; les gènes de la classe II (D) qui codent pour d'autres structures présentes à la surface des cellules du système immunitaire. Ces structures semblent servir à la coopération entre les diverses sous-populations de cellules immunocompatibles. Ainsi les messages nécessaires concernant un certain antigène sont émis et reçus pour aboutir à la fabrication des anticorps et des cellules tueuses ; les gènes de la classe III codent pour les facteurs du complément dont le rôle est aussi essentiel pour la réponse immunitaire.

Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf



Fichier issu d'une page EMAN : http://eman-archives.org/ComiteHistoireCNRS/items/show/136?context=pdf