

marqueurs fluorescents dans la membrane, afin d'observer l'ouverture des pores.

Ces dernières années, les recherches sur la thérapie génique ont conduit à plusieurs méthodes pour percer des trous dans les membranes cellulaires. L'électroporation, par exemple, est l'application d'un courant électrique dans la solution où les cellules sont suspendues. De même, l'ajout de détergents ou, plus généralement, de molécules amphiphiles variées modifie la perméabilité membranaire. Toutefois ces méthodes, bien qu'efficaces, restent mal comprises. Avec O. Sandre et L. Moreaux, F. Brochard a préféré étirer les membranes en utilisant les forces naturelles d'adhérence des vésicules à des supports (des verres diversément traités). En l'absence de tension, les vésicules se comportent comme des bulles «dégonflées» ; leur membrane ondule sous l'effet des incessants mouvements aléatoires des molécules. En revanche, les vésicules étirées par l'adhérence à un support ont une membrane qui se déplie et se met sous tension. Les premières observations ont montré que les vésicules devenaient alors extrêmement perméables à l'eau. Des pores s'ouvraient-ils et se fermaient-ils trop rapidement pour être observés au microscope ?

Pour observer l'ouverture des pores, les physico-chimistes ont modifié la viscosité de la solution où ils créaient les vésicules. Ils ont alors eu le temps d'observer que les vésicules sont comme une membrane tendue : quand un pore s'ouvre dans la membrane, celle-ci laisse échapper un peu de la solution interne ; la membrane est alors moins étirée, et le pore se referme. Plus on augmente la viscosité de la solution, plus on ralentit cette fuite du liquide encapsulé, et plus les trous restent ouverts longtemps.

Dans l'eau, les pores sont «avortés», car la fuite très rapide de liquide relâche la tension avant que les pores atteignent une taille observable par microscopie de fluorescence. Trop petits pour être observés, ces pores sont cependant géants à l'échelle moléculaire (100 à 1 000 fois plus gros que les canaux membranaires), ce qui explique que les vésicules sous tension, même très faible, deviennent des passoirs ! Les cellules vivantes, elles, sont équipées d'un cytosquelette (une sorte de filet de pêche, avec des mailles 100 fois plus grosses que des molécules) fixé à la membrane, ce qui limite sans doute la taille des pores. L'étude de globules rouges devrait révéler comment le cytosquelette modifie la taille des pores transitoires.

Comprenant la dynamique de ces pores, pourra-t-on administrer, avec les médicaments, des molécules qui modifieront la tension des membranes cellulaires, afin de favoriser l'entrée des principes actifs ?

Ver à soie transgénique

Aujourd'hui, on sait incorporer, à la demande, des gènes dans le génome du ver à soie : on pourra extraire de la soie des protéines d'intérêt thérapeutique.

Domestiqué depuis plus de 4 000 ans, le ver à soie, *Bombyx mori*, survit grâce à l'homme. Pour s'y métamorphoser, les vers fabriquent un cocon constitué d'un fil unique, plus long que un kilomètre. On dévide le cocon en faisant fondre, dans l'eau chaude, la protéine (le grès) qui protège le fil et assure la cohésion de l'ensemble. On récupère alors le précieux fil de soie sans le casser.

La soie est produite par les glandes séricigènes ; la chenille bave par une filière un fil fluide qui se solidifie rapidement à l'air. Les équipes lyonnaises de Gérard Chavancy et Bernard Mauchamp, à l'Unité séricicole de l'INRA, et de Pierre Couble, du Centre de génétique moléculaire et cellulaire du CNRS, ont obtenu une lignée transgénique de ver à soie qui produit, en même temps que la soie, la protéine codée par un gène étranger, introduit dans le génome du ver.

Cette lignée a été longue à obtenir, car, contrairement à la drosophile, voire aux petits mammifères, les vers à soie ne se sont pas laissés aisément modifier. Pour transformer la drosophile, on utilise depuis longtemps des constructions génétiques constituées d'un élément transposable auquel on accole le gène à étudier. L'élément transposable assure l'intégration de cette construction dans le génome de la drosophile. On a ainsi

obtenu des centaines de lignées de drosophiles génétiquement modifiées, mais la méthode n'est pas utilisable pour les vers à soie. Pour les mammifères, la méthode est encore plus simple, puisque l'on injecte directement dans le noyau de l'œuf modifié le gène étudié, lequel s'intègre spontanément dans le génome. En revanche, la méthode ne s'applique pas pour le ver à soie, car le noyau est difficilement accessible.

L'équipe de l'INRA semblait donc dans une impasse, quand on a découvert un autre «véhicule» de gène, l'élément nommé *PiggyBac*. Grâce à lui, on réussit désormais à introduire des gènes étrangers dans le génome du ver à soie. Dans les deux heures qui suivent la fécondation d'un œuf, on y introduit la construction génique, constituée de *PiggyBac* auquel est accolé le gène étranger ; l'ensemble s'intègre dans l'ADN du receveur. Lorsque le gène étranger est correctement intégré, il se transmet de génération en génération.

Quel est l'intérêt des vers à soie transgéniques ? Les glandes séricigènes «livrent» directement le produit recherché en même temps que la soie filée. Quand on réussit à faire produire à un animal une protéine d'intérêt, il reste souvent une difficulté de taille : sa récupération. Quand la protéine est produite par toutes les cellules de l'animal transgénique, on doit trouver une méthode d'extraction, par exemple en broyant les cellules, ce qui présente le risque d'extraire, en même temps que la protéine recherchée, des substances indésirables spécifiques de l'animal et entraînées avec la protéine intéressante lors du procédé de purification. C'est pourquoi l'on a mis au point des mammifères transgéniques : on recueille la protéine d'intérêt produite par les glandes mammaires en trayant



Larve de ver à soie transgénique, où l'on a introduit le gène d'une protéine fluorescente verte.

M. Mauchamp - Unité nationale séricicole - INRA

l'animal. Or le ver à soie expulse spontanément le contenu de ses glandes séricigènes, que l'on récupère facilement. On sépare la protéine recherchée des protéines de la soie sans risque de contamination par des constituants cellulaires.

Ainsi, une lignée stable de vers à soie modifiés donnerait une protéine facile à récupérer dans le fil de soie. De surcroît, ces usines de production miniatures seraient très flexibles, car on sait maîtriser les élevages de vers à soie, notamment le moment de l'éclosion des œufs.

Ce type d'élevage serait beaucoup moins contraignant que celui des souris ou autres mammifères transgéniques.

Après avoir fourni le matériau des soieries qui ont fait la renommée des soyeux lyonnais, les vers à soie – génétiquement modifiés – fourniront peut-être demain des protéines thérapeutiques faciles à purifier et dont on pourrait ajuster la production à la demande. En outre, comme on maîtrise désormais l'introduction de nouveaux gènes dans le génome de ces vers, les équipes lyonnaises espèrent les rendre

résistants aux champignons, virus et autres parasites qui dévastent parfois les élevages. On pourrait aussi introduire des gènes qui codent d'autres types de soie (par exemple, le fil d'araignée, plus résistant que le fil de soie) ; on obtiendrait ainsi un fil qui aurait les propriétés de la soie, mais une résistance supérieure, de sorte que de nouvelles applications seraient envisageables. Enfin, le ver à soie étant totalement inféodé à l'homme, il ne risque pas de disséminer dans la nature les gènes que l'on y introduira.

Lutte tous azimuts contre le VIH

Plusieurs nouvelles molécules inhibent la réplication du VIH in vitro. Combien d'entre elles seront efficaces in vivo ?

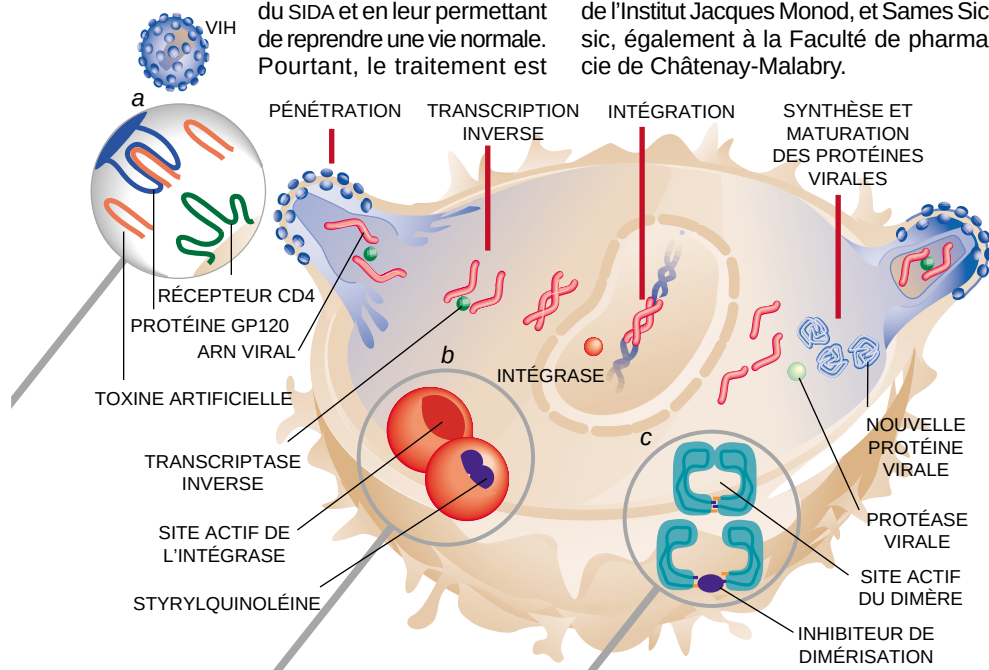
Les trithérapies, des traitements qui associent plusieurs molécules luttant contre le virus de l'immunodéficience humaine, le VIH, ont radicalement changé le pronostic des personnes séropositives en retardant la phase du SIDA et en leur permettant de reprendre une vie normale. Pourtant, le traitement est

lourd, on ignore ses effets à long terme et, s'il réduit considérablement la quantité de virus dans l'organisme, il ne l'élimine pas. Plusieurs équipes continuent à chercher d'autres moyens de lutte contre ce virus : soit en essayant de l'empêcher de pénétrer dans les cellules, comme une équipe du département d'ingénierie et d'études des protéines du CEA, à Saclay, dirigé par André Menez ; soit en empêchant l'intégration du matériel génétique viral au génome cellulaire, comme l'équipe de Jean d'Angelo, à la Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry ; soit encore en perturbant l'étape de synthèse des protéines virales, comme Michèle Reboud, de l'Institut Jacques Monod, et Sames Sicsic, également à la Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry.

Ainsi, l'équipe de Saclay a synthétisé une mini-protéine destinée à contrer la toute première étape de l'infection, c'est-à-dire l'interaction du virus et de la cellule qu'il cherche à infecter. Le virus reconnaît ses cibles, les lymphocytes T, grâce à la protéine virale d'amarrage, nommée GP120 ; cette glycoprotéine de l'enveloppe virale a pour cible cellulaire une protéine de la membrane des lymphocytes, le récepteur CD4. Dans la partie centrale de ce récepteur, une boucle de neuf acides aminés constitue l'élément clé de la reconnaissance : la GP120 a une cavité où s'insère cette boucle protubérante du CD4 en forme d'épingle à cheveux.

La mini-protéine sélectionnée par l'équipe de Saclay est une toxine de venin de scorpion, la scyllatoxine, dont une région ressemble beaucoup à celle en épingle à cheveux du récepteur CD4. Les biologistes ont remplacé les acides aminés de la boucle de la toxine par les neuf acides aminés de la boucle fonctionnelle du récepteur CD4. Ils ont ainsi obtenu une toxine artificielle (dont on inactive la fonction toxique) qui reproduit exactement la zone d'ancrage de la protéine virale GP120 sur les lymphocytes T humains. Quand on met des cellules en culture en présence de cette toxine artificielle, cette dernière bloque les sites de fixation, et interdit toute liaison du VIH aux cellules humaines. Jusqu'à présent les tentatives d'inhibition de l'entrée du virus dans les cellules ont échoué, car le virus, extrêmement variable, se transforme et réussit à se fixer malgré les leurres. Cette nouvelle molécule, dont il reste à évaluer le potentiel *in vivo*, réussira peut-être là où d'autres ont échoué en raison de la parfaite similitude de sa structure avec celle de la boucle du récepteur CD4.

L'équipe de Châtenay-Malabry, pour sa part, s'est intéressée à l'intégrase virale, une enzyme qui intervient au cours de l'insertion de l'ADN proviral dans l'ADN cellulaire (une fois le génome viral intégré, il profite de la machinerie cellulaire pour produire des protéines virales et de nouveaux



Pour éviter soit l'infection des lymphocytes T par le VIH, soit la réplication du virus, on essaye de mettre au point des substances qui attaquent le virus en divers points stratégiques. On a isolé du venin de scorpion une molécule (a, en rouge) dont la structure ressemble beaucoup à celle de la boucle du récepteur CD4 sur laquelle s'ancore la protéine virale GP120. Cette molécule bloque le site de reconnaissance et devrait empêcher l'interaction du virus et de sa cellule cible. L'enzyme intégrase sert à l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire ; en bloquant le site actif de cette enzyme par des styrylquinolines (b, en violet), on l'empêche d'agir et on évite cette intégration. Enfin, l'enzyme protéase apprête les protéines virales synthétisées par la machinerie cellulaire pour former de nouvelles particules virales : en évitant la formation de son site actif, grâce à un inhibiteur de la dimérisation (c, en violet), on évite la libération de nouvelles particules virales.

virions). Pour fonctionner, cette enzyme requiert des ions magnésium. Dès lors, on a recensé différentes molécules capables de complexer ces ions pour les séquestrer, notamment des composés de la famille des quinoléines. En associant deux sous-unités de telles molécules, on a obtenu une styrylquinoléine inhibitrice qui s'insère dans l'intégrase et bloque son fonctionnement. Testées sur des cultures cellulaires, les styrylquinoléines présentent une bonne activité anti-virale à des concentrations très faibles, non toxiques. Ces inhibiteurs semblent empêcher la fixation du magnésium sur le site actif de l'enzyme.

À la fin du cycle de réplication du VIH, une autre enzyme, la protéase virale, intervient en découpant les protéines virales, qui peuvent alors s'assembler en nouvelles particules virales infectieuses. Cette enzyme est constituée de deux sous-unités identiques ; chaque monomère est inactif, car le site actif de l'enzyme n'apparaît qu'avec la formation du dimère.

Les antiprotéases thérapeutiques dont on dispose aujourd'hui bloquent le site actif de l'enzyme déjà dimérisée. M. Reboud et S. Sicsic ont envisagé un autre mécanisme d'inhibition de la protéase : ils en empêchent la formation, de sorte que le site actif n'est pas constitué. Pour ce faire, ils tirent parti de la structure particulière de ce dimère, parfaitement symétrique : chaque monomère a une extrémité dite C-terminale et une autre dite N-terminale, et les deux monomères s'assemblent, notamment, en intercalant leurs extrémités N- et C-terminales. Pour inhiber la formation du dimère, ils ont créé des « pinces moléculaires » qui enserment l'extrémité C-terminale d'un monomère, empêchant ainsi son interaction avec l'autre monomère.

Ces pinces sont constituées d'un espaceur rigide de type aromatique (naphthalène ou pyridine), sur lequel sont greffés deux tripeptides qui assurent la liaison de l'inhibiteur aux acides aminés de l'extrémité C-terminale. Les espaceurs rigides étant d'excellents inhibiteurs de la dimérisation, on cherche à en augmenter la biodisponibilité. Ces composés, qui visent une cible moléculaire différente des antiprotéases disponibles aujourd'hui, forment une nouvelle classe de candidats thérapeutiques qui bloqueraient la prolifération des virus résistants aux antiprotéases actuelles.

Ces exemples illustrent l'effervescence qui continue de régner dans les laboratoires où l'on recherche des moyens de lutte contre le VIH. Toute la question reste de savoir combien de ces traitements potentiels démontreront qu'ils sont également efficaces *in vivo* et bien tolérés.

Marie-Thérèse Landousy

L'interférence du désordre

La rétrodiffusion de la lumière par des atomes mesure leurs propriétés quantiques.

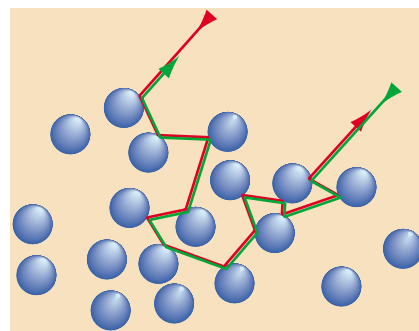
Pourquoi ne voit-on pas le disque solaire à travers une épaisse couche de nuages ? Parce que les multiples réflexions et réfractions des rayons lumineux sur les molécules du nuage font perdre à l'onde lumineuse la trace de sa direction initiale. Toutefois, dans une direction privilégiée, celle du retour arrière de la lumière vers l'émetteur, on observe une surintensité de lumière diffusée. Cette rétrodiffusion n'avait été observée que sur des diffuseurs classiques, tel le lait ou les anneaux de Saturne, jamais sur des atomes. En éclairant un paquet d'atomes froids, donc quasi-immobiles, avec un laser, nous avons observé un pic de rétrodiffusion de la lumière incidente dont l'amplitude traduit la structure quantique des atomes.

La rétrodiffusion est un cas particulier de la propagation d'une onde dans un milieu où les « réflecteurs » sont disposés de manière aléatoire. Éclairons un sac de billes de verre à l'aide d'un faisceau laser. La lumière diffusée a un aspect granulaire, très irrégulier, comme la « neige » sur l'écran de télévision. Cette structure, nommée tavelure, résulte de l'interférence des ondes qui ont emprunté de multiples trajets. Dans certaines directions, l'interférence entre les ondes est constructive (zone brillante sur un écran), ailleurs, elle est destructive (zone sombre). Secouons maintenant les billes, de façon à en modifier la configuration, et renouvelons l'expérience. La nouvelle figure d'interférence est radicalement différente : les zones sombres et brillantes se sont déplacées et déformées.

Quand on ajoute les figures d'interférence de tavelure, l'intensité de la lumière devrait être la même dans toutes les directions : les interférences constructives ou des-



Lorsque l'on éclaire un groupe d'atomes froids à l'aide d'un laser, la majeure part de la lumière est diffusée de manière aléatoire. La lumière rétrodiffusée (en sens opposé à celui de la lumière laser), interfère constructivement et donne naissance à un pic de rétrodiffusion.



Une onde qui suit le chemin rouge effectue la même séquence de diffusion, mais en sens inverse, qu'une onde qui suit le chemin vert. Ces chemins sont géométriquement réciproques.

tructives devraient se compenser. Qu'observe-t-on en faisant l'expérience ? L'intensité est bien uniforme, excepté dans un secteur angulaire étroit autour de la direction de rétrodiffusion, où apparaît un pic d'intensité. Ce pic résulte d'une interférence entre chemins optiques réciproques : les rayons lumineux, qui empruntent deux chemins identiques, mais en sens inverse, interfèrent constructivement (voir la figure ci-dessus).

Précisons : dans la direction inverse de la direction initiale, l'interférence est toujours constructive, car la différence de longueur des chemins réciproques est exactement nulle, de sorte que les amplitudes des ondes réciproques s'ajoutent. Cet effet est observé quelle que soit la nature des ondes (ondes acoustiques, ondes de matière) quand elles se propagent dans un milieu aléatoire.

Que voit-on lorsque le milieu diffusant est constitué d'atomes froids ? Pour le savoir, nous avons envoyé un faisceau laser sur un gaz d'atomes de rubidium refroidis. Le pic de rétrodiffusion est bien présent, mais son amplitude est inférieure à celle qui est prévue par la théorie des diffuseurs classiques. L'intensité de la lumière transmise dépend de la séquence d'excitation des atomes. Tous les atomes ne sont pas exactement dans le même état quantique : la diffusion sur un premier atome, puis sur un deuxième, ne sera pas équivalente aux diffusions sur le chemin réciproque, où les atomes sont excités dans l'ordre inverse (dans la diffusion directe, le premier atome est excité avant le deuxième, tandis que, sur le chemin de l'onde réciproque, le deuxième est excité avant le premier). Les « chemins quantiques » ne sont pas réciproques.

La réalisation de la même expérience sur un condensat de Bose-Einstein, où les atomes solidaires sont tous dans le même état quantique, accentuera vraisemblablement les effets d'interférence entre les chemins de diffusion multiple.

Ch. MINIATURA, G. LABEYRIE et R. KAISER, Institut non linéaire de Nice