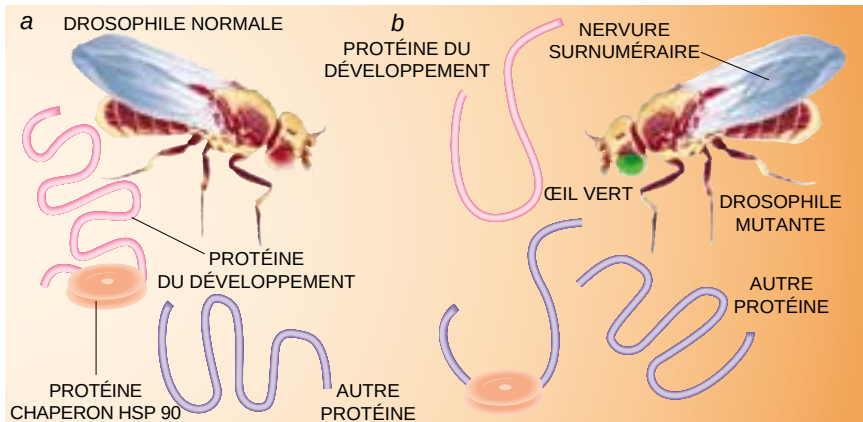




La protéine chaperon HSP 90, dans les conditions normales (a), corrige diverses mutations naturellement présentes dans les protéines du développement : la drosophile est normale. En cas de stress (b), par exemple une chaleur ou une luminosité excessive, survenant au cours du développement embryonnaire, la protéine Hsp 90, qui sert aussi à préserver la conformation biologiquement active d'autres protéines, ne fait plus face à la tâche et ne corrige plus les mutations normalement silencieuses : les drosophiles naissent avec diverses anomalies morphologiques, par exemple des yeux anormaux (ici verts) et des nervures surnuméraires ou absentes sur les ailes.

présence d'un gène *Hsp 90* non fonctionnel, des anomalies latentes et spécifiques de chaque lignée sont transmissibles de génération en génération. Ces anomalies sont donc présentes dans le génome de la lignée, mais elles sont corrigées tant que le gène *Hsp 90* est actif. Ainsi, il existe naturellement, chez la drosophile, une réserve de mutations qui touchent la

morphologie. Dans un environnement normal, ces mutations sont masquées par la présence de Hsp 90 qui remodèle les protéines dont elle a la charge pour leur redonner une conformation correcte. Lors d'un stress survenant pendant la période embryonnaire, Hsp 90 donne la priorité aux protéines qui sont en cours de dénaturation et non plus aux protéines du déve-

loppement qu'elle «chaperonne» habituellement. Dépassée par un surcroît de travail, elle n'assure pas une de ses deux fonctions et les mutations morphologiques silencieuses s'expriment. En l'absence de stress, lorsque les mutations que Hsp 90 doit réparer sont trop nombreuses, un même effet de seuil se manifeste (la protéine est «débordée») et des monstres apparaissent aussi.

Ainsi, contrairement au dogme admis, de nombreuses anomalies du développement ne résultent pas d'un stress, mais préexistent avant son apparition. Ce stock de mutations stables représente peut-être un patrimoine de survie : normalement dormant, il ne s'exprime qu'en cas de changements brusques de l'environnement et donne naissance, parce que la protéine Hsp 90 ne fait plus face à sa tâche, à des espèces morphologiquement différentes. Cette hypothèse, qui expliquerait les sauts brusques de l'évolution et l'apparition rapide d'espèces peut-être mieux adaptées aux nouvelles conditions, est séduisante, mais son extrapolation de la drosophile aux vertébrés reste à confirmer.

Marie-Thérèse LANDOUSY

Le menu des australopithèques

Ces primates arboricoles fréquentaient la savane.

Le régime alimentaire de l'homme est étonnamment variable et diversifié. Cette caractéristique, parmi d'autres, lui a permis de peupler une bonne partie de la planète. Quand cette adaptabilité est-elle apparue dans l'histoire de l'évolution ? Que mangeaient, par exemple, les australopithèques, nos lointains parents africains ? L'analyse de l'émail des dents d'*Australopithecus africanus*, qui vivait il y a trois millions d'années, révèle que cet hominidé, malgré son adaptation morphologique à la vie arboricole et sa dentition de frugivore, trouvait aussi une part importante de sa nourriture dans la savane.

Les plantes fabriquent les molécules nécessaires à leur croissance par photosynthèse, en utilisant en particulier le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère. Il existe deux mécanismes de photosynthèse, qui ont des conséquences différentes sur le carbone 13, isotope stable du carbone (le noyau atomique du carbone contient généralement six protons et six neutrons ; le carbone 13 contient

un neutron supplémentaire) : dans les arbres et les buissons dont la photosynthèse est «en C₃», le carbone 13 est plus fortement éliminé que dans les plantes herbacées des milieux tropicaux, à la photosynthèse «en C₄».

On retrouve cette différence dans l'émail des dents des herbivores : en milieu tropical, la teneur isotopique en carbone 13 est plus grande pour ceux qui broutent la savane que pour ceux qui mangent des feuilles d'arbres. La teneur isotopique des dents des carnivores révèle, à son tour, la nature de leurs proies, et ainsi de suite au long de la chaîne alimentaire. La mesure de cette teneur isotopique complète donc utilement les informations déduites de la forme et de la disposition des dents.

Matt Sponheimer, de l'Université Rutgers, et Julia Lee-Thorp, de l'Université du Cap, ont mesuré la teneur isotopique en carbone 13 des dents de quatre *Australopithecus africanus*, découverts dans la grotte Sud-africaine de Makapansgat, ainsi que de 65 mammifères de 19 espèces, découverts sur le même site. Les valeurs obtenues répartissent les animaux en deux groupes principaux : d'un côté, les herbivores de savane, parmi lesquels plusieurs bovidés, un

équidé et un phacochère ; de l'autre, les herbivores forestiers, dont une girafe, des gazelles et un rhinocéros.

Les australopithèques n'appartiennent à aucun de ces groupes : leur teneur isotopique moyenne en carbone 13 les rapproche plutôt du seul carnivore analysé, une hyène. En fait, les valeurs obtenues pour les quatre individus sont assez différentes les unes des autres. Ces australopithèques, dont la morphologie est adaptée à une vie arboricole, et qui s'approvisionnaient principalement de fruits et de feuilles, s'aventuraient très régulièrement dans la savane : entre un quart et la moitié de leur nourriture en provenait. Qu'y mangeaient-ils ? Des herbes ? Des racines ? À moins que, comme les chimpanzés actuels, ils n'aient agrémenté leurs repas d'insectes herbivores, voire de petits mammifères. La chasse, longtemps présentée comme une spécificité humaine

parmi les primates, aurait alors une origine plus ancienne que l'apparition du genre *Homo*, auquel nous appartenons. Des résultats préliminaires sur quelques représentants anciens de ce genre, de 2,5 millions d'années, ne montreraient d'ailleurs pas de profonde différence entre leur régime alimentaire et celui des australopithèques.



Le clonage des mammifères

IAN WILMUT

On sait désormais obtenir des mammifères qui ont tous le même patrimoine génétique. Des applications biomédicales des techniques de clonage sont à l'étude.



John Chadwick Photographic and PPL Therapeutics



1. MEGAN ET MORAG (ci-contre) ont été les premiers mammifères clonés à partir de cellules en culture. Par cette même technique, on a obtenu des moutons porteurs de gènes humains. Ces animaux produisent du lait qui contient des protéines thérapeutiques humaines ; on les extrait par un traitement approprié (à gauche).

Roddy Field, Roslin Institute

Au cours de l'été 1995, la naissance de deux agneaux, à l'Institut Roslin, près d'Édimbourg, ouvrit une nouvelle ère en biologie et en médecine : Megan et Morag, nées toutes deux d'une mère porteuse, n'étaient pas le fruit de l'union d'un spermatozoïde et d'un ovule ; leur matériel génétique provenait de cultures de cellules qui avaient été prélevées sur un embryon de neuf jours. Autrement dit, Megan et Morag sont des copies génétiques, ou clones, de l'embryon initial.

Avant la naissance de ces agneaux, des biologistes avaient déjà obtenu un mouton, des bovins et d'autres animaux en copiant génétiquement des cellules isolées à partir de tout jeunes embryons. Les cultures de cellules étant aujourd'hui mieux maîtrisées, nous espérons améliorer la méthode de clonage. Megan et Morag sont la preuve que, même des cellules partiellement différenciées, c'est-à-dire partiellement spécialisées, sont génétiquement reprogrammables et fonctionnent alors

comme celles d'un tout jeune embryon. La plupart des biologistes pensaient que cela n'était pas possible.

Nous avons alors poursuivi cette expérience en tentant le clonage à partir de cellules prélevées sur un fœtus de 26 jours ainsi que sur une brebis adulte. Les cellules de la brebis ont engendré Dolly, le premier mammifère cloné à partir d'un adulte. L'annonce de la naissance de Dolly, en février 1997, eut un retentissement considérable, peut-être parce que Dolly prouvait que le clonage des



êtres humains était théoriquement possible. Je milite pour qu'un tel clonage ne soit jamais réalisé, mais si l'on réussissait à fabriquer des clones à partir de cultures cellulaires de tissu, on améliorerait la sélection des animaux d'élevage, on trouverait de nombreuses applications biologiques et médicales, et l'on obtiendrait des réponses à diverses questions biologiques importantes.

Toute méthode de clonage, telle celle qui sert à l'obtention de copies d'animaux à partir de cellules d'embryons,

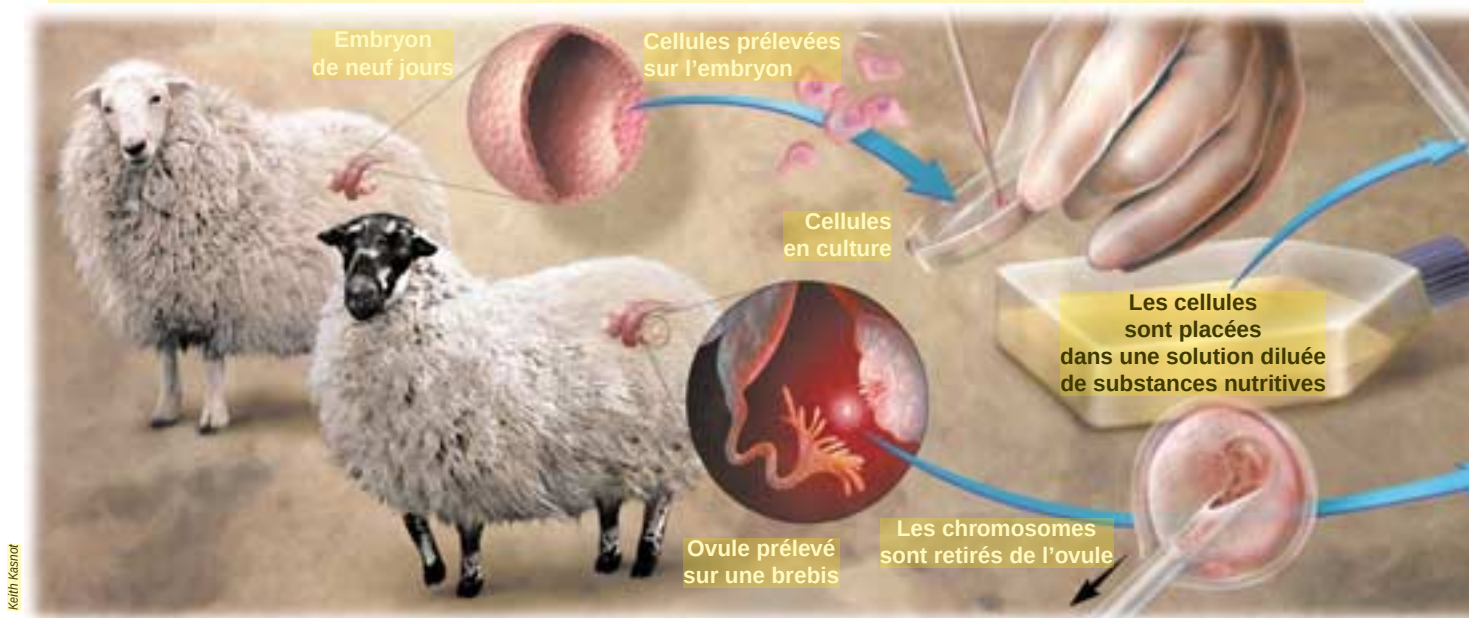
repose sur un transfert de noyau cellulaire. Un transfert de noyau nécessite deux cellules : une cellule réceptrice, généralement un ovule non fécondé prélevé peu après l'ovulation (de tels ovules se développent dès qu'on les stimule correctement), et une cellule donneuse, celle qui doit être copiée. À l'aide d'un microscope à haute résolution, un manipulateur maintient l'ovule récepteur à l'extrémité d'une pipette, par aspiration, et il utilise une micropipette pour en éliminer les chromosomes,

les éléments qui contiennent l'ADN cellulaire (à ce stade, les chromosomes ne sont pas encore enfermés dans un noyau). Puis on fusionne la cellule donneuse tout entière avec l'ovule receveur. Certaines des cellules fusionnées commencent alors à se développer comme dans un embryon normal et elles forment finalement un jeune animal, quand elles sont implantées dans l'utérus d'une mère porteuse.

Dans nos expériences avec des cellules en culture, nous avons rendu

Comment Megan et Morag ont été créées

On a combiné des cellules en culture et des ovules pour produire des embryons qui se sont ensuite développés et ont donné des animaux clonés.



les cellules donneuse et réceptrice compatibles en coordonnant les cycles de duplication de l'ADN et ceux de production des ARN messagers (les molécules qui sont créées à partir de l'ADN et qui commandent la synthèse des protéines). Plus précisément, nous avons choisi comme cellules donneuses des cellules que nous avons rendues quiescentes en diminuant la concentration en substances nutritives dans le milieu de culture : leur ADN n'était pas en cours de duplication au moment du transfert. De plus, nous avons stimulé électriquement l'ovule après le transfert, afin de favoriser la fusion des cellules et d'imiter la stimulation que déclenche un spermatozoïde quand il pénètre dans un ovule.

Après la naissance de Megan et de Morag, qui montrait que l'on pouvait produire une descendance viable à partir de cellules issues d'embryons, nous avons déposé des demandes de brevets

et commencé des expériences pour voir si l'on obtiendrait des descendants à partir de cellules plus différenciées. En collaboration avec les Laboratoires PPL Therapeutics, nous avons testé des fibroblastes fœtaux (des cellules de peau, par exemple) et des cellules de mamelle provenant d'une brebis gravide de trois mois et demi. Les cellules mammaires se multiplient rapidement à ce stade de la gestation, et elles étaient susceptibles de continuer à le faire en culture. En outre, leurs chromosomes sont stables, de sorte que toute l'information génétique est vraisemblablement préservée. Le clonage réussi de Dolly à partir d'une culture de cellules mammaires et celui d'autres agneaux à partir de fibroblastes ont montré que notre protocole expérimental est fiable et reproductible.

Tous les animaux que nous avons ainsi clonés ressemblent plus, comme prévu, à la brebis dont provient le noyau

qu'aux mères porteuses ou aux donneuses d'ovules. Des tests génétiques ont confirmé que Dolly est réellement le clone d'une brebis adulte. Elle provient vraisemblablement d'une cellule mammaire différenciée, bien qu'il soit impossible d'exclure qu'elle dérive d'une des très rares cellules peu différenciées qui étaient présentes dans la glande mammaire. Depuis, d'autres équipes ont utilisé une technique presque identique pour créer des clones viables de bovins et de souris à partir de cellules en culture, y compris des cellules issues d'animaux non gravides.

Bien que reproductible, le clonage par transfert nucléaire a ses limites. Quelques bovins et quelques moutons clonés sont anormalement gros, mais on avait déjà observé ce phénomène avec les embryons simplement mis en culture avant la gestation ; on ignore pourquoi. Plus important, peut-être, le transfert nucléaire n'est pas très efficace.

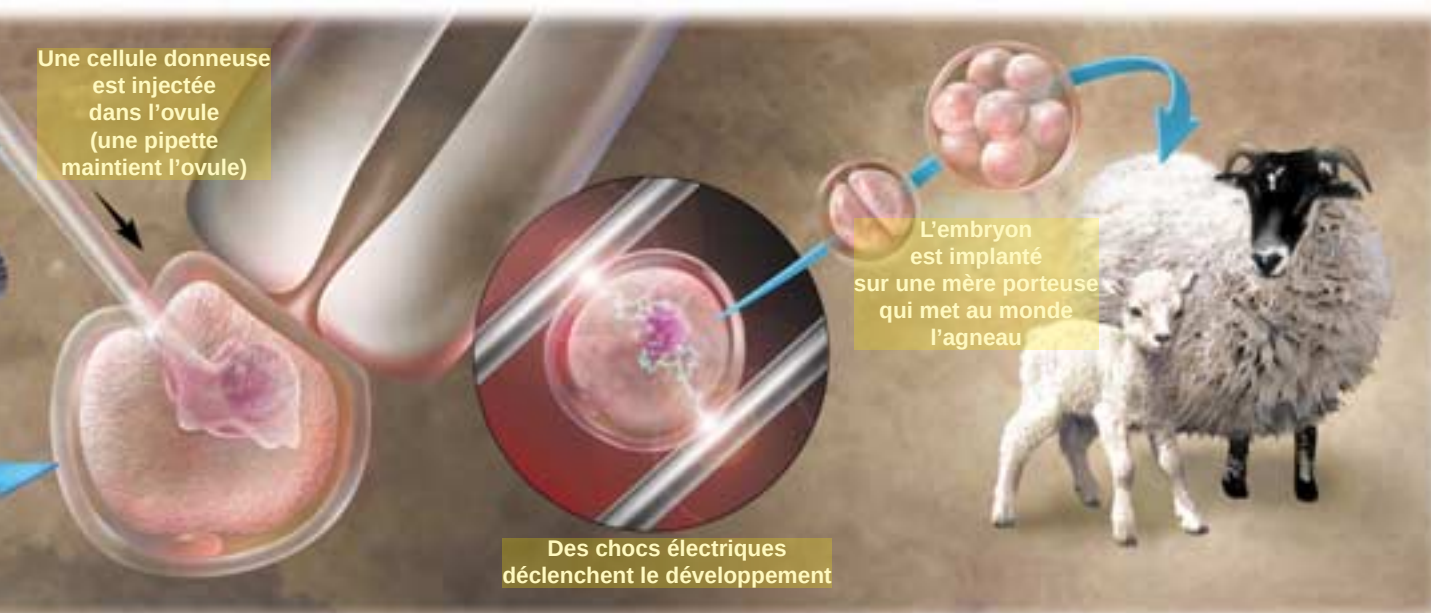
La quiescence est-elle la clé du clonage ?

Toutes les cellules que nous avons utilisées comme donneuses dans nos expériences de transfert nucléaire étaient quiescentes, c'est-à-dire qu'elles ne fabriquaient pas d'ARN messager, lequel commande la synthèse des protéines. La plupart des cellules passent une grande partie de leur cycle de vie à recopier des séquences d'ADN en ARN messager. Nous avons choisi des cellules quiescentes parce qu'on sait les conserver plusieurs jours dans le même état et parce que Keith Campbell, dans notre équipe, avait observé qu'elles étaient particulièrement adaptées au clonage.

Il pensait qu'un transfert nucléaire ne serait réussi que si la production d'ARN dans le noyau de la cellule donneuse était inhibée, car, dans un embryon précoce, les cellules sont contrôlées

par des protéines et par les ARN fabriqués dans le précurseur de l'ovule. Ce n'est qu'environ trois jours après la fécondation que l'embryon commence à fabriquer son propre ARN. Comme les chromosomes d'un ovule ne fabriquent pas d'ARN, les noyaux provenant de cellules quiescentes semblaient avoir davantage de chances de se développer après le transfert.

Il est également possible que les chromosomes de noyaux quiescents soient dans un état particulièrement favorable. Nous pensons que, dans l'ovule receveur, des molécules régulatrices agissent sur le noyau transféré pour le reprogrammer. Bien que nous ne sachions pas de quelles molécules il s'agit, les chromosomes d'une cellule quiescente y sont peut-être particulièrement sensibles.



Au cours d'expériences de transfert nucléaire réalisées sur des grenouilles il y a presque 30 ans, à Cambridge, John Gurdon a observé que le nombre des embryons qui survivent et qui deviennent des têtards diminue à mesure que les cellules donneuses sont prélevées à des stades de différenciation plus avancés. Nous avons obtenu les mêmes résultats avec des mammifères. D'après toutes les études de clonage décrites, une proportion notable d'embryons et de fœtus meurent : un à deux pour cent seulement d'embryons franchissent le cap de la naissance. De surcroît, la mortalité postnatale est importante.

On ignore la cause de cette surmortalité, mais elle indique que l'on ne maîtrise pas parfaitement la reprogrammation génétique qui s'effectue avant la naissance de jeunes animaux viables. Il suffit qu'un seul gène s'exprime de façon inappropriée pour que l'embryon cesse de se développer, faute d'une protéine vitale. Or une telle reprogrammation met probablement en jeu des milliers de gènes selon un scénario partiellement aléatoire. Diverses améliorations techniques pourraient réduire la mortalité.

La méthode de production de jeunes animaux à partir de cellules en culture

facilitera la réalisation d'animaux génétiquement modifiés, ou transgéniques, particulièrement importants pour la recherche et pour la préparation de protéines humaines thérapeutiques. En effet, la technique classique d'obtention d'animaux transgéniques est excessivement lente et peu efficace. On injecte un fragment génétique – une

séquence d'ADN comportant un gène intéressant – dans un grand nombre d'ovules fécondés. Quelques chromosomes incorporent ce fragment d'ADN, qui s'exprime alors dans cette cellule, dans les cellules filles, et chez l'animal après la naissance. Ces animaux transmettent le fragment d'ADN à leur descendance.

Au contraire, par un traitement chimique simple, on peut faire pénétrer un fragment d'ADN dans des cellules. Quand ces cellules sont ensuite utilisées comme donneuses lors d'un transfert nucléaire, toute leur descendance clonée porte l'ADN étranger. L'Institut Roslin et les Laboratoires PPL Therapeutics ont ainsi produit des animaux transgéniques plus efficacement que par la méthode de micro-injection.

Nous avons incorporé au génome d'un mouton le gène du facteur IX humain, une protéine sanguine de la coagulation utilisée dans le traitement de l'hémophilie B. Au cours de cette expérience, le gène du facteur IX était associé à un gène de résistance aux antibiotiques : ainsi, en ajoutant aux cellules en culture une dose toxique d'antibiotique (de la néomycine), on tue toutes les cellules qui n'ont pas incorporé l'ADN étranger, et l'on ne



2. DOLLY (à droite) fut une célébrité mondiale en 1997 : c'était le premier mammifère cloné à partir de cellules prélevées sur un animal adulte. Aujourd'hui adulte, Dolly a donné naissance à Bonnie (à gauche), un agneau en pleine santé issu d'un accouplement et d'une gestation classiques.