



1. LES CADAVRES BIEN CONSERVÉS, tel ce bébé mammoth vieux de 42 000 ans trouvé en Russie, fournissent une profusion d'informations sur les espèces disparues. Toutefois, seul l'ADN peut révéler les processus physiologiques qui sous-tendaient la vie de ces animaux.

■ SUR LE WEB

Explications interactives de la reconstitution de l'hémoglobine de mammoth : ScientificAmerican.com/aug2012/mammoth

■ BIBLIOGRAPHIE

J. Enk *et al.*, Complete Columbian mammoth mitogenome suggests interbreeding with woolly mammoths, *Genome Biology*, vol. 12, n° 5, R51, 2011.

K. L. Campbell *et al.*, Substitutions in woolly mammoth hemoglobin confer biochemical properties adaptive for cold tolerance, *Nature Genetics*, vol. 42(6), pp. 536-540, 2010.

C. Lalueza-Fox *et al.*, A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals, *Science*, vol. 318, pp. 1453-1455, 2007.

J. Krause *et al.*, Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of *Elephantidae*, *Nature*, vol. 439, pp. 724-727, 2006.

jamais observée chez l'homme moderne. Comme dans le cas de l'allèle du mammoth, l'analyse fonctionnelle de ce variant montre qu'il est moins actif que la version standard produite par l'homme moderne.

Chez ce dernier, on a aussi repéré des variants du gène *MC1R* dont l'activité est réduite de façon similaire : ils proviennent d'êtres humains d'ascendance européenne aux cheveux roux et à la peau claire. Nous en avons déduit que certains Néandertaliens étaient peut-être aussi roux et clairs de peau (bien qu'il s'agisse d'une mutation différente). Sous les hautes latitudes où vivaient les hommes de Neandertal, les rayons ultraviolets nécessaires à la synthèse de la vitamine D sont peu abondants. Une couleur claire de peau a pu favoriser l'absorption de ces rayons, qui pénètrent moins bien les peaux foncées.

Avec ces travaux, nous avons montré qu'il est possible de reconstruire des caractéristiques observables à partir d'ADN ancien. Nous étions prêts à utiliser ce nouvel outil pour appréhender les processus vitaux des espèces éteintes. Et à faire ainsi de la vraie paléophysiologie.

Aujourd'hui, tous les mammifères de grande taille qui se sont adaptés au froid – du renne au bœuf musqué – ont un système d'artères et de veines étroitement associées et antiparallèles, tout au long des membres et de leurs extrémités. Ce *rete mirabile* (réseau admirable) constitue un échangeur de chaleur à contre-courant

d'une grande efficacité. Le sang artériel chaud et oxygéné, qui circule du cœur vers les extrémités, transmet la majeure partie de sa chaleur au sang veineux froid qui retourne vers le cœur. Le gradient thermique résultant de ce processus maintient les extrémités en contact avec des surfaces froides, tel le pied, à une température juste suffisante pour éviter le gel, ce qui réduit les pertes de chaleur. Nul besoin de brûler plus de calories pour réchauffer les extrémités, ce qui confère un avantage certain aux espèces arctiques pendant l'hiver, lorsqu'il est si difficile de se procurer des calories supplémentaires.

Paradoxalement, cette adaptation anatomique prive les extrémités de l'énergie calorifique nécessaire au fonctionnement de l'hémoglobine. Chez les vertébrés, cette protéine des globules rouges se charge de l'oxygène provenant des poumons et le redistribue dans les tissus. Toutefois, rompre la liaison chimique entre l'hémoglobine et l'oxygène requiert de l'énergie (même si la liaison est faible). Aussi la capacité de l'hémoglobine à distribuer l'oxygène diminue-t-elle à mesure que la température baisse.

Une hémoglobine moins sensible au froid

Néanmoins, divers mécanismes procurent aux mammifères habitués au froid une source de chaleur supplémentaire suffisante pour casser la liaison entre l'hémoglobine et l'oxygène. Ces mécanismes (pas encore compris en détail) mettent en jeu la liaison d'autres molécules à l'hémoglobine, au sein des globules rouges. La formation de liaisons chimiques entre ces molécules et l'hémoglobine libère de la chaleur qui participe alors à la libération de l'oxygène.

L'équipe de K. Campbell – qui jusqu'à travaillait indépendamment de celle de M. Hofreiter – a émis l'hypothèse que l'hémoglobine des mammoths avait elle aussi évolué d'une façon qui facilitait la libération d'oxygène en période de grand froid. Pour savoir si de telles mutations s'étaient produites et pour déterminer leur nature, l'équipe décida de séquencer les gènes de l'hémoglobine du mammoth et de les comparer avec les séquences homologues de l'éléphant d'Asie.

Effectuées en collaboration avec Alan Cooper, de l'Université d'Adélaïde, en Australie, les premières tentatives de séquençage

des deux gènes de mammoth produisant les chaînes de globine, qui constituent l'os-sature de l'hémoglobine, ont échoué. Les échantillons de mammoth disponibles n'étaient pas de qualité suffisante. C'est alors que nous avons uni nos efforts. À partir de l'extrait d'ADN utilisé pour étudier le gène *MC1R*, nous avons obtenu la séquence codante complète des deux gènes d'hémoglobine du mammoth et, par conséquent, les séquences d'acides aminés des deux chaînes de globine.

Le séquençage a révélé que l'une des chaînes de globine du mammoth diffère de celle des éléphants d'Asie en trois acides aminés (sur 146). Ce trio de substitutions d'acides aminés contenait-il la signature génétique de l'adaptation physiologique au froid ? Un indice chez l'homme appuyait fortement cette hypothèse. Un variant humain rare de l'hémoglobine, nommé hémoglobine Rush, porte l'une des mutations trouvées chez le mammoth. Bien qu'une seule substitution d'acide aminé distingue la protéine Rush de la protéine sanguine standard humaine, cette différence modifie considérablement les propriétés biochi-

miques de l'hémoglobine : comme pour les animaux adaptés au froid, la sensibilité de la protéine à la température est nettement réduite. L'hémoglobine Rush récupère de l'énergie en se liant à d'autres protéines, ce qui facilite la libération de l'oxygène dans des conditions glaciales.

L'étape suivante consistait à reproduire l'hémoglobine ancienne et l'observer en action. Pour obtenir des copies des deux gènes qui codent les chaînes de l'hémoglobine de mammoth, nous avons d'abord extrait des gènes d'hémoglobine du sang

IL EST POSSIBLE DE RECONSTRUIRE des caractéristiques observables à partir de l'ADN ancien.

d'éléphants d'Asie, puis nous y avons introduit les trois mutations repérées dans les séquences des gènes de mammoth. Insérés dans la bactérie *Escherichia coli*, les gènes obtenus ont été traduits en une hémoglobine fonctionnelle, identique à celle qui, il y a 43 000 ans, circulait dans le sang du mammoth qui avait livré son ADN.

Pour la première fois, nous avons la possibilité d'analyser un processus phy-

siologique essentiel d'une espèce éteinte avec la même méthode que si l'animal était encore vivant. Nous avons mesuré la capacité, tant de l'hémoglobine de mammoth que de celle de l'éléphant, à capter et à libérer l'oxygène à différentes températures physiologiques dans des solutions reproduisant l'environnement chimique interne des globules rouges.

Dans des conditions de grand froid, la protéine de mammoth, comme l'hémoglobine Rush, libérait beaucoup plus facilement l'oxygène que l'hémoglobine de l'éléphant d'Asie (les deux hémoglobines fonctionnaient de la même façon à la température normale du buste, aux alentours de 37 °C). À l'instar de l'hémoglobine des mam-

mifères arctiques actuels, l'hémoglobine de mammoth capte d'autres molécules et en retire la source de chaleur supplémentaire nécessaire pour libérer sa charge d'oxygène. Pourtant, cette propriété est survenue à la suite de mutations différentes, a montré la comparaison des séquences génétiques de l'hémoglobine de mammoth avec celles de leurs parents modernes. Le variant humain Rush, quant à lui, ne confère pas

Du génome du mammoth à son épigénome

Avec le mammoth laineux, nous disposons d'un modèle de choix pour étudier l'évolution des fonctions biologiques chez un organisme éteint. Cette lignée s'est émancipée du milieu subtropical et s'est adaptée à un régime alimentaire ultrasécialisé de brouteur dans les steppes de plus en plus arides et froides d'Eurasie (et d'Amérique). Ces adaptations écologiques et alimentaires se sont traduites par des modifications morphologiques et physiologiques majeures : développement d'une toison laineuse, épaississement de la couche graisseuse du derme, organe de graisse brune à rôle calorifique au niveau de la nuque, modification du fonctionnement rénal, mode de croissance différent, modifications dentaires et squelettiques, etc., permettant de répondre au froid, à une nourriture strictement herbacée et à une faible disponibilité en eau.

En se focalisant sur les mutations dans les séquences codant les protéines, la paléophysiologie n'accède pourtant encore qu'à la partie émer-

gée de l'iceberg. Parmi les millions de mutations qui différencient un mammoth d'un éléphant à l'échelle du génome, seule une infime proportion est responsable de changements dans la séquence d'acides aminés des protéines, l'énorme majorité de ces mutations affectant des séquences non codantes de l'ADN. Il est donc probable que le changement phénotypique des globines des mammoths décrit par les auteurs soit l'exception plutôt que la règle. Comment, dans ce cas, expliquer l'extrême différenciation des mammoths ?

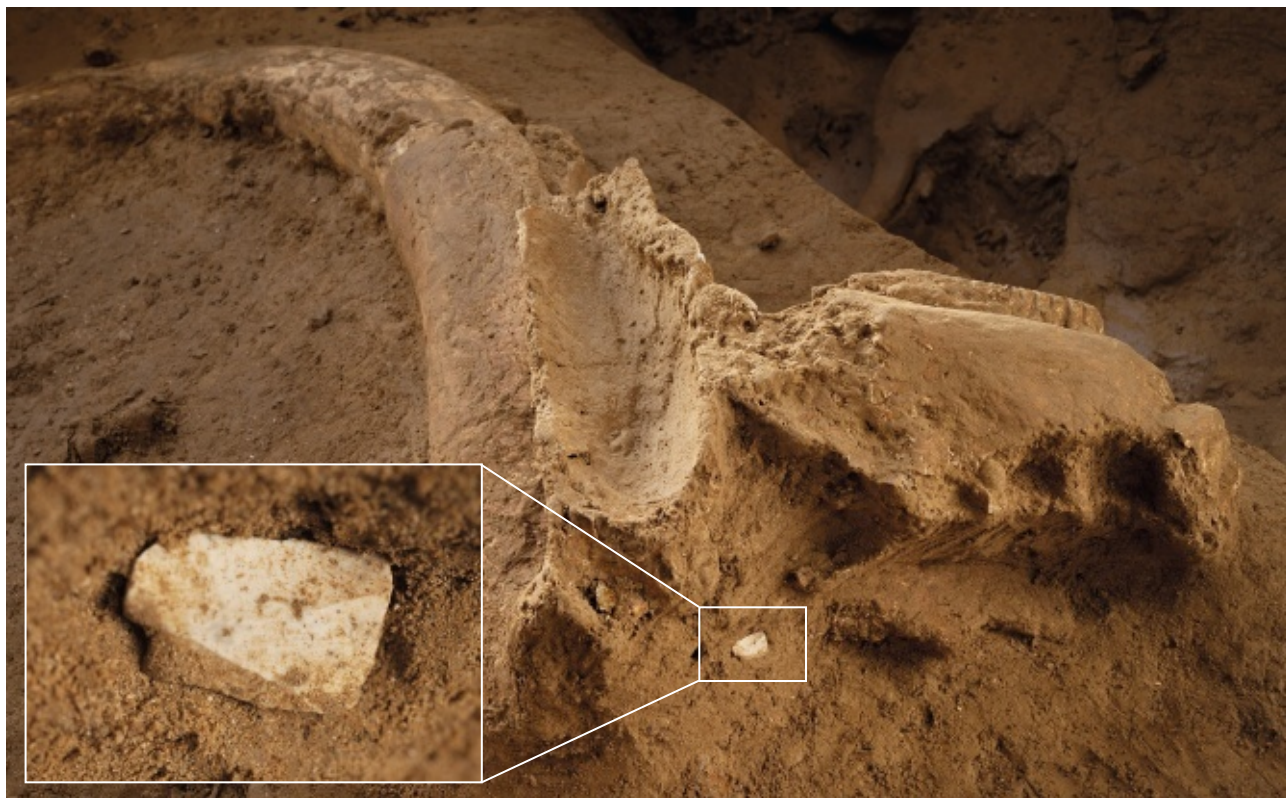
La solution résiderait dans les séquences régulatrices de l'expression des gènes qui ne codent pas de protéines, mais influent sur leur expression de façon directe ou indirecte par des réseaux de régulation complexes. Ce sont ces séquences qui sont responsables des différences extrêmes de morphologie et de physiologie observées par exemple au sein d'un organisme entre un neurone et un globule blanc, pourtant pourvus de la même in-

formation génétique. Toutefois, si l'information contenue dans le génome est de mieux en mieux comprise, celle, plus large, de l'épigénome, qui définit ces réseaux de régulation, est encore aujourd'hui difficilement accessible au sein des restes d'ADN ancien : les manifestations moléculaires de l'épigénome (méthylations de l'ADN, modifications des protéines histones, autour desquelles il s'enroule au sein de la chromatine) ne survivant majoritairement pas dans les restes anciens, les paléogénéticiens sont contraints d'analyser des signatures indirectes de l'épigénome, son « empreinte fossile » dans les molécules d'ADN : par exemple, certaines bases de l'ADN (cytosine) sont plus facilement dégradées quand elles sont méthylées et on recherche donc spécifiquement ces traces de modifications. La paléogénomique fonctionnelle n'en est donc encore qu'à ses balbutiements.

Plusieurs équipes dans le monde explorent ces questions avec des stratégies variées visant à mieux com-

prendre l'évolution du mammoth tant dans le temps que dans l'espace. Tandis que certains analysent l'évolution fine des mammoths laineux *via* les carcasses gelées de Sibérie et d'Alaska, d'autres s'intéressent au contraire aux autres formes et espèces de mammoths, morphologiquement plus différents, mais dont l'ADN demeure beaucoup plus difficile d'accès, car non préservé par le froid. C'est notamment le cas du mammoth découvert tout récemment en France à Changis-sur-Marne (voir la figure 2), un des trois spécimens presque complets connus à ce jour sur notre territoire. Des prélèvements ont été réalisés dès le dégagement du squelette et ces restes sont actuellement en cours d'analyse au Muséum national d'histoire naturelle afin de déterminer si son ADN a été préservé.

Régis Debruyne
Paléogénéticien, UMS2700 Outils et méthodes de la systématique intégrative, Département systématique et évolution, MNHN, Paris



Denis Gliksmann/INRAP

2. IL Y A QUELQUES MOIS, LE SQUELETTE presque complet d'un mammoth a été mis au jour à Changis-sur-Marne par l'équipe de Grégory Bayle, de l'INRAP. Un fragment de silex découvert en contact direct d'un fragment du crâne du mammoth (*zoom*) suggère une inter-

vention humaine sur la carcasse de l'animal. Les paléophysiologistes du Muséum national d'histoire naturelle analysent les ossements dans l'espoir d'y détecter de l'ADN préservé. Le mammoth aurait vécu il y a au moins 130 000 ans.

d'avantage adaptatif au froid. La mutation déstabilise la protéine, de sorte que ceux qui la portent souffrent d'anémie chronique. Pourquoi une telle conséquence chez l'homme ? Cette question reste à éclaircir.

Comparer des populations d'une même espèce

L'adaptation de l'hémoglobine n'est qu'une pièce du puzzle. Pour comprendre comment le mammoth laineux s'est adapté au grand froid, bien d'autres aspects de son adaptation biochimique sont encore à élucider. Sans compter que l'énigme se pose pour des dizaines d'autres espèces éteintes. Toutefois, il est peu probable que l'énorme quantité de génomes anciens séquencés ces dernières années soient d'une grande aide : la technique utilisée pour les obtenir, dite de séquençage aléatoire global, produit un échantillonnage au hasard qui, s'il fournit un tableau d'ensemble, n'est en général pas assez précis ou complet pour une utilisation en paléophysiologie. Seul un tel séquençage

répété de multiples fois serait exploitable, mais le coût en serait exorbitant.

Une nouvelle technique de séquençage, nommée capture sélective par hybridation, permet une meilleure couverture des gènes cibles pour un coût bien moindre : des fragments d'ADN sont capturés spécifiquement par des séquences de nucléotides disposées sur une micropuce – des morceaux de séquence des gènes cibles bien conservés d'une espèce à l'autre, par exemple. Cette technique devrait permettre des études à grande échelle comparant, par exemple, les réseaux de gènes des mammoths de Sibérie, ayant vécu à des périodes interglaciaires plus douces, et ceux de mammoths qui vivaient durant des pics glaciaires, lorsque les glaciers avaient atteint leur épaisseur maximale. On devrait aussi pouvoir comparer des populations d'une même espèce séparées géographiquement, tels les mammoths de Sibérie et ceux d'Amérique (mammoth dit de Colomb). Ce type d'étude non seulement permettrait d'évaluer la diversité génétique au sein d'une espèce, mais fournirait aussi de précieuses informations sur

les nouvelles adaptations physiologiques en réponse aux conditions géographiques et climatiques locales.

Aussi exaltantes que soient ces perspectives (imaginez 50 000 ans d'évolution défilant sous vos yeux), notre capacité à analyser la physiologie des organismes du passé est limitée. Dans l'idéal, les protéines éteintes devraient être étudiées *in vivo*, car nombre de leurs propriétés ne sont perceptibles que dans un organisme vivant. Or il est peu probable que cela soit réalisable à court terme : il faudrait pour cela faire revivre une espèce éteinte.

Pour l'heure, nous devons nous contenter d'observer des protéines anciennes dans des tubes à essai et des cellules en culture. Déjà, nous utilisons ces techniques pour explorer la physiologie d'autres créatures disparues, dont le mastodonte et la rhytine de Steller, un mammifère marin arctique connu aussi sous le nom de vache des mers. Le clonage de ces animaux restera un fantasme pour longtemps encore. En attendant, protéine par protéine, nous continuerons à insuffler la vie, par petites touches, à ces animaux disparus. ■