

Origine des cellules souches hématopoïétiques chez l'embryon d'amphibien

Chez l'embryon de xénope, deux sites principaux d'émergence des cellules souches hématopoïétiques (CSH) ont été mis en évidence. Il s'agit des îlots sanguins ventraux, analogues au sac vitellin, et d'un territoire dorsal proche du pronéphros appelé DLP (dorso lateral plate) analogue à la région AGM (aorta gonado mesonephros) des embryons d'amniotes. Le modèle amphibien, compte tenu de son mode de développement, offre la possibilité d'étudier les étapes précoces de

l'hématopoïèse. Ainsi, des expériences récentes de lignage cellulaire chez l'embryon de xénope au stade 32 cellules ont fourni des informations précieuses quant à l'origine embryonnaire des CSH primitives et définitives. Par ailleurs, la caractérisation et l'analyse du profil d'expression de gènes essentiels à l'hématopoïèse des mammifères chez les vertébrés à sang froid suggèrent que les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hématopoïèse sont très bien conservés au cours de l'évolution.

Du fait en particulier de leur mode de développement, les amphibiens constituent un modèle expérimental de choix pour l'étude de l'ontogenèse du système hématopoïétique. Les stades précoces de leur embryogenèse sont en effet facilement observables et accessibles à l'expérimentation. Par ailleurs, il est possible d'analyser la fonction de gènes impliqués dans l'hématopoïèse précoce par l'injection dans de jeunes embryons au stade 2 cellules de constructions d'ADNc sauvages (expériences de surexpression) ou tronquées (expériences de perte de fonction). Dans cette revue, nous décrivons des résultats récents relatifs à la mise en place du compartiment hématopoïétique chez deux espèces d'amphibiens: l'axolotl du Mexique (*Ambystoma mexicanum*) et le xénope (*Xenopus laevis*).

État de la question chez les vertébrés à sang chaud

L'hématopoïèse définit le processus de formation des cellules sanguines. Celles-ci dérivent et se différencient à

partir de rares cellules souches situées dans la moelle osseuse chez l'homme adulte. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont dotées de deux propriétés essentielles. Elles sont capables de produire toutes les catégories de cellules matures circulant dans le sang (globules rouges, lymphocytes, plaquettes, granulocytes, macrophages...). Elles sont dites pluripotentes. D'autre part, les CSH sont capables de s'autorenouveler, ce qui signifie qu'elles peuvent se diviser sans pour autant s'engager dans un processus de différenciation et perdre leur potentiel. La biologie des CSH fait l'objet actuellement de très nombreux travaux intéressants à la fois le biologiste étudiant la détermination des lignages cellulaires et le clinicien, car ces cellules peuvent être directement utilisées dans le traitement des leucémies, pour des transplantations ou encore pour des approches de thérapie génique.

Dans les années 1970, Moore *et al.* ont mis en évidence le rôle joué par une annexe embryonnaire de l'embryon de souris, le sac vitellin, dans la genèse des cellules sanguines.

L'ablation du sac vitellin au jour 7, avant l'établissement de la circulation sanguine, conduit à un défaut d'hématopoïèse au niveau du foie fœtal [1]. De la même façon, les cellules du sac vitellin issu d'embryons au jour 7 donnent en culture *in vitro* de nombreuses colonies de cellules hématopoïétiques. Cette propriété ne se retrouve pas dans des cultures d'embryons dépourvus de sac vitellin [2]. Des équipes françaises et hollandaises ont ensuite démontré, chez l'embryon de poulet puis de souris, qu'un territoire embryonnaire proche de l'aorte appelé splanchnopleure para-aortique (Sp-Pa) puis à un stade plus avancé du développement AGM (*aorta gonado mesonephros*) relayait le sac vitellin dans la production des CSH ([3-5] et *m/s* 1997, n°2, p. 225). Ces travaux montrent clairement que le sac vitellin donne naissance principalement aux premières populations d'érythroblastes assurant les étapes précoces du développement de l'embryon. Les CSH définitives colonisant les organes hématopoïétiques dérivent quant à elles de l'AGM [6].

Induction du programme génétique hématopoïétique chez les amphibiens

Les CSH sont déterminées très tôt au cours du développement embryonnaire suite à l'induction du mésoderme qui a lieu pendant la segmentation chez le xénope et qui intéresse les cellules de la région équatoriale appelée zone marginale. Sous l'effet de signaux inducteurs d'origine maternelle émis par les cellules du pôle végétatif, ces cellules donneront des dérivés mésodermiques. Ces signaux inducteurs du mésoderme appartiennent aux facteurs de croissance de la famille TGF- β (*transforming growth factor*) et FGF (*fibroblast growth factor*) (figure 1).

La molécule BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*), un membre de la famille TGF- β joue selon toute vraisemblance un rôle essentiel dans la mise en route du programme génétique hématopoïétique. Chez l'embryon de xénope, le facteur BMP4 est exprimé au niveau des zones marginales ventrale et latérale. L'injection de molé-

cules d'ADNc codant pour le facteur BMP4 dans les blastomères au stade 2 cellules conduit ainsi à une ventralisation des embryons et à la formation exagérée de cellules sanguines [7, 9]. Inversement, l'injection de constructions tronquées pour les récepteurs aux BMP4, créant une mutation dominante négative, conduit à des embryons dorsalisés et à l'absence de cellules sanguines [9, 10]. Par ailleurs, des calottes animales ectodermiques prélevées sur des embryons injectés avec BMP4 expriment le gène codant pour la globine. Ce résultat suggère que le facteur BMP4 est impliqué directement dans la spécification des CSH. Un des gènes cibles de la voie de transduction médiée par BMP4 est le gène *Mix-1*. Le produit de ce gène est un facteur de transcription à homéodomaine de type Pax. L'injection dans l'embryon de xénope de constructions *Mix-1* tronquées au niveau du domaine de liaison à l'ADN empêche la signalisation BMP4 et la mise en place du lignage hématopoïétique [11].

Émergence des CSH chez l'embryon d'amphibien

Chez le xénope, deux sites embryonnaires d'émergence des CSH ont également été mis en évidence. Il s'agit des îlots sanguins ventraux (VBI, *ventral blood islands*), équivalents chez l'amphibien du sac vitellin des embryons d'amniotes, et d'un territoire dorsal proche du pronéphros appelé DLP (*dorso lateral plate*), analogue à la Sp-Pa/AGM (figure 2). Chez l'embryon de xénope, les VBI contribuent à l'hématopoïèse primitive tandis que les cellules issues de la DLP contribuent exclusivement à l'hématopoïèse définitive. Le problème de l'origine embryonnaire des cellules sanguines chez le xénope a fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années. En 1997, Turpen *et al.* ont développé une approche élégante de greffes de territoires hématopoïétiques entre embryons de ploïdies différentes (2N/3N). L'analyse par cytométrie en flux du contenu en ADN des érythrocytes et des thymo-

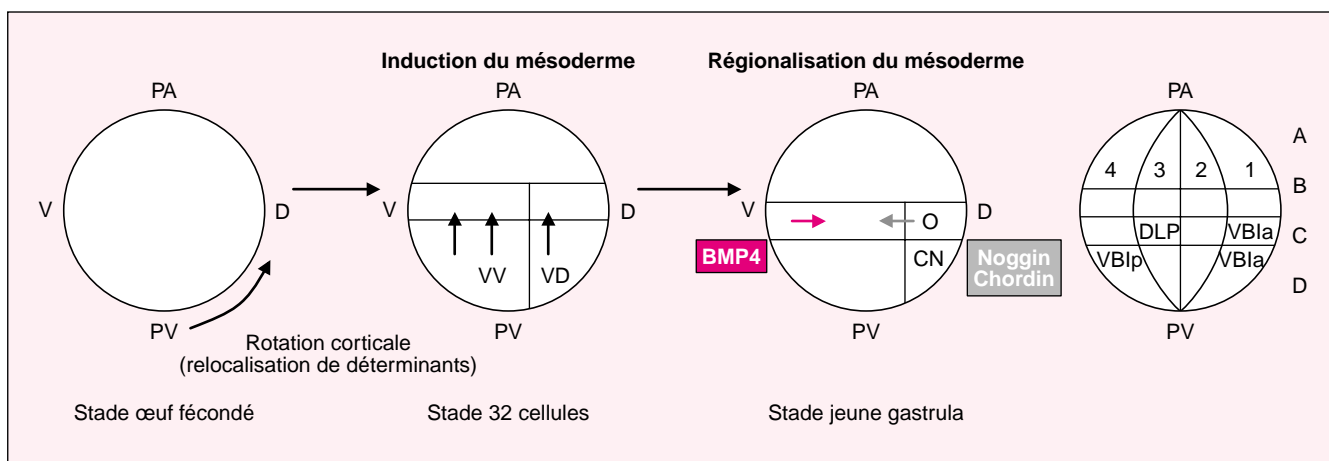


Figure 1. **Mise en place du feuillet mésodermique et des territoires hématopoïétiques chez l'embryon de xénope.** Suite à la fécondation, des déterminants morphogénétiques sont déplacés du pôle végétatif vers la face dorsale de l'œuf. Ces déterminants sont essentiels à la mise en place de l'axe dorsoventral et à la définition du centre de Nieuwkoop (CN) puis du centre organisateur de Spemann (O). Au stade 32 cellules, les blastomères sont désignés en fonction de leur position suivant les axes de symétrie (animal/végétatif et dorso/ventral). L'induction du mésoderme commence au stade 32 cellules jusqu'à la fin de la segmentation sous l'action de molécules inductrices (FGF, TGF β) émises par le pôle végétatif. Le mésoderme induit au niveau de la zone marginale est ensuite régionalisé suivant l'axe de symétrie dorso-ventrale sous l'action de molécules telles que BMP4 (ventralisante) et Noggin et Chordin (dorsalisantes). Les sites d'émergence des cellules souches hématopoïétiques primitives puis définitives chez le xénope sont les îlots sanguins ventraux (VBI) et la plaque mésodermique dorsale (DLP). Ils dérivent respectivement des blastomères D4 (VBI postérieur), C1 et D1 (VBI antérieur) et C3 (DLP). PA: pôle animal; PV: pôle végétatif; D: face dorsale; V: face ventrale; VV: végétatif ventral; VD: végétatif dorsal.

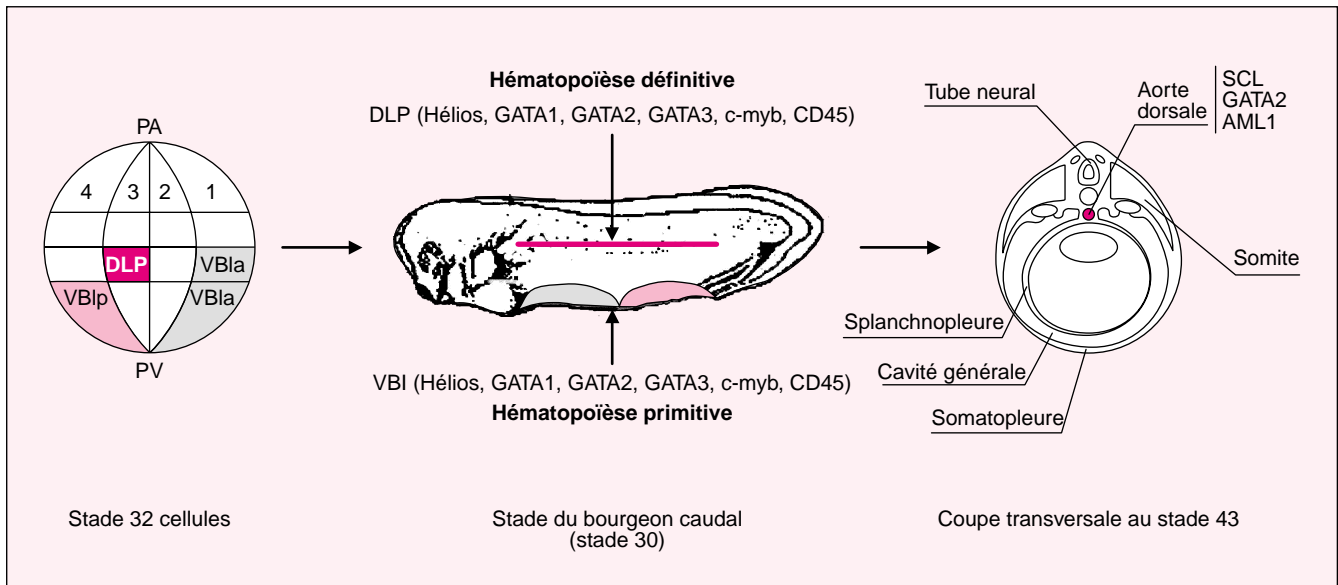


Figure 2. **Représentation schématique du lignage des cellules sanguines chez l'embryon de xénope.** Les cellules sanguines dérivent des blastomères C1, D1, D4 et C3 de l'embryon au stade 32 cellules. Les blastomères C1, D1 et D4 contribuent à la formation des îlots sanguins ventraux (antérieur et postérieur) qui produisent les premières populations d'érythrocytes. Les blastomères C3 sont en revanche à l'origine des cellules sanguines au niveau de la plaque mésodermique dorsale (DLP) et des foyers hématopoïétiques au niveau de l'aorte dorsale. Sur le plan moléculaire, les produits d'expression des gènes Hélios, GATA2, GATA3, CD45 et c-myb sont détectés au niveau des VBI et de la DLP des embryons au stade du bourgeon caudal. Des transcrits codant pour les protéines SCI/Tal1, GATA2 et AML1 sont ensuite mis en évidence au niveau de l'aorte dorsale des embryons au stade 43. VBIa : VBI antérieur ; VBIP : VBI postérieur ; DLP : dorso lateral plate. Les stades du développement sont définis d'après la table de Nieuwkoop et Faber [25].

cytes de jeunes larves a montré que les CSH issues des VBI et de la DLP ont jusqu'à la fin du stade neurula le même potentiel hématopoïétique. Ainsi, la restriction des VBI à l'hématopoïèse primitive et la contribution majeure de la DLP à l'hématopoïèse définitive ne sont finalement acquises qu'à la fin de la neurulation [12]. Ces approches de transplantation avaient également révélé que toutes les cellules sanguines chez le xénope ont une origine embryonnaire commune et sont issues de la zone marginale latéro-ventrale. L'origine exclusivement ventrale des cellules sanguines chez cet amphibien a toutefois été contestée récemment par des approches d'étude de lignage. Tracey *et al.* en analysant le profil d'expression et la fonction du gène *Cbfa2/AML1*, requis pour l'hématopoïèse définitive chez la souris, ont en effet montré que la partie antérieure des VBI est d'origine dorsale [13]. Parallèlement, Lane et Smith ont réalisé des études de lignage des cellules sanguines en

injectant des marqueurs tels que la rhodamine dextran (RDA) ou la protéine fluorescente GFP dans différents blastomères aux jeunes stades de la segmentation. Leurs observations confirment celles de Tracey *et al.* et montrent que les cellules sanguines du xénope dérivent de tous les blastomères végétatifs des embryons au stade 32 cellules. Il apparaît dans ces études que même le blastomère C1 à l'origine du centre organisateur de Spemann, donnant classiquement des dérivés mésodermiques dorsaux (chorde et un peu de muscles), contribue à la mise en place du lignage hématopoïétique [14].

Le problème de l'origine embryonnaire des territoires hématopoïétiques et de leur contribution à l'hématopoïèse du xénope a été finalement résolu par un travail réalisé dans le laboratoire de R. Patient en Angleterre et publié dans la revue *Cell* en septembre 2000 [15]. Les résultats de ce travail fondé sur la combinaison d'expériences de

lignage cellulaire et d'analyse d'expression génique démontrent très clairement que les VBI et la DLP ont une origine embryonnaire distincte et que seules les cellules dérivant de la DLP sont à l'origine des foyers hématopoïétiques au niveau de l'aorte dorsale, et donc des CSH définitives. Ainsi, les cellules à l'origine des VBI dérivent des blastomères D4, C1 et D1 alors que les cellules à l'origine de la DLP dérivent exclusivement des blastomères C3 des embryons de xénope au stade 32 cellules (*figures 1 et 2*).

L'origine des cellules sanguines chez les amphibiens urodèles a également été étudiée par des approches de greffes entre embryons de ploïdies différentes. Deparis et Jaylet ont ainsi souligné l'importance du mésoderme latéro-ventral des embryons de pleurodèle en étroite association avec l'ébauche hépatique dans la mise en place du lignage hématopoïétique [16]. Sur la base d'expériences similaires, ces auteurs avaient en effet montré que la couche périphérique

du foie embryonnaire contenait différentes catégories de cellules souches capables d'engendrer toutes les cellules sanguines de l'animal (érythrocytes, granulocytes et thymocytes) [17]. Chez l'axolotl, les îlots sanguins contribuent à la production des premières populations d'érythrocytes chez l'embryon au stade du bourgeon caudal [18]. D'autre part, l'anticorps monoclonal 34.38.6 qui reconnaît un déterminant antigénique à la surface des précurseurs hématopoïétiques marque quelques cellules dans le mésoderme ventral des embryons avant l'éclosion. Ces cellules migrent ensuite vers les ébauches du foie et du thymus qu'elles colonisent (A. Tournefier, communication personnelle).

Marqueurs moléculaires de l'hématopoïèse

De nombreux gènes impliqués dans l'hématopoïèse embryonnaire ont été caractérisés chez les amphibiens. C'est le cas en particulier des gènes *SCL/Tal1* et *GATA2* dont la fonction est essentielle pour une hématopoïèse normale chez les mammifères ([19, 29] et *m/s* 1997, n° 1, p. 125; 1994, n° 11, p. 1174). Chez le xénope, les produits d'expression de ces deux gènes sont détectés au cours du développement dans certaines cellules localisées ventralement puis ensuite au niveau des VBI et de la DLP [12]. Selon toute vraisemblance, *SCL* intervient en aval dans la cascade des événements induits par *BMP4* dans la mesure où l'injection de constructions codant pour des récepteurs *BMP4* dominants négatifs inhibe l'expression du gène *SCL* dans la région ventrale des embryons. Par ailleurs, des explants de zones marginales dorsales prélevées sur des embryons ayant subi au stade 2 cellules des injections d'ARNm *SCL* et cultivés jusqu'au stade 36/37 (jeunes larves), expriment la protéine globale. La surexpression de *SCL* n'affecte pas pour autant la régionalisation du feuillet mésodermique suivant les axes de symétrie. Ces résultats suggèrent donc que le facteur *SCL* est impliqué dans la spécification du lignage hématopoïétique une fois que les processus d'induction et

de régionalisation du mésoderme ont eu lieu [21]. Au stade neurula, les produits d'expression d'autres gènes hématopoïétiques tels que *c-myb*, *GATA3* et *CD45* sont détectés à la fois au niveau des VBI et de la DLP [12] et très récemment, Cia-Uitz et collaborateurs ont montré, qu'à un stade plus avancé du développement, des transcrits *SCL/Tal1*, *GATA2* et *AML1* sont détectés par hybridation *in situ* au niveau de l'aorte dorsale [15] (figure 2).

Chez l'axolotl, nous avons récemment isolé par criblage d'une banque de thymocytes deux clones codant pour les isoformes *Ikaros 1* et *2* [22]. Le gène *Ikaros* a été découvert chez la souris par Georgopoulos *et al.* en 1992, sur la base d'un crible génétique visant à identifier des gènes régulateurs de la différenciation lymphocytaire T [23]. Les produits d'expression de ce gène, résultant de phénomènes d'épissages alternatifs, sont des facteurs de transcription à doigts de zinc de la famille Krüppel. *Ikaros* est en fait un des gènes régulateurs clés de la différenciation des progéniteurs lymphocytaires chez les vertébrés dans la mesure où des souris homozygotes pour une mutation (dominante négative, DN), au niveau des doigts de zinc liant l'ADN, présentent une absence complète de différenciation des cellules T, B et NK ([23] et *m/s* 2000, n° 5, p. 685). Il a également été démontré que des CSH de moelle osseuse de souris *Ikaros DN^{-/-}* étaient incapables de reconstituer l'hématopoïèse à long terme de souris irradiées suggérant ainsi que les facteurs *Ikaros* pourraient jouer un rôle important dans l'activité même des CSH murines [24]. L'isoforme *Ik-1* chez l'axolotl montre deux particularités structurales relatives à la présence d'une région 3'UT très longue d'environ 2 500 pb et à la délétion d'un motif de 100 pb comprenant le premier doigt de zinc en position N-terminale. L'isoforme *Ik-2* présente comme son équivalent murin une absence complète de l'exon 3. De ce fait, les isoformes *Ik-1* et *Ik-2* chez l'axolotl présentent le même nombre de doigts de zinc (figure 3). Il est intéressant de noter que l'isoforme *Ik-2* d'axolotl présente la délétion d'un

décapeptide situé juste en 5' du domaine d'activation des facteurs *Ikaros*. Cette délétion, unique chez les vertébrés à sang froid, est par ailleurs retrouvée dans le thymus et la moelle osseuse chez l'homme et également au niveau de certaines isoformes *Ikaros* chez des enfants atteints de leucémies lymphoblastiques LAL (figure 3) [25].

Au cours du développement embryonnaire de l'axolotl, l'expression du gène *Ikaros* est détectée au stade du bourgeon caudal contemporain des premiers battements cardiaques. Sur la base d'expériences de dissection d'embryons et de coloration à la benzidine (qui permet de suivre la migration des érythrocytes par une réaction d'oxydation en présence de l'hémoglobine et d'eau oxygénée), il apparaît que la production des ARNm *Ikaros* est limitée à la région ventrale des embryons contenant les îlots sanguins ventraux même après établissement de la circulation sanguine. Ces données moléculaires confirment les résultats obtenus par les approches de l'embryologie expérimentale et de l'immunohistochimie. Elles suggèrent un schéma d'hématopoïèse simplifiée chez les amphibiens urodèles dans lequel le mésoderme ventral contenant les îlots sanguins ventraux constituerait le principal site d'émergence des CSH.

Conclusions

Il existe donc un consensus général quant à l'existence de deux sites principaux d'émergence des CSH chez les embryons d'amniotes et de xénope. Le sac vitellin ou son équivalent chez l'amphibien, les îlots sanguins ventraux, assurent exclusivement la genèse des érythrocytes embryonnaires. La production des CSH définitives est ensuite assurée par un territoire proche de l'aorte, l'AGM ou la plaque mésodermique dorsale. Le schéma d'hématopoïèse semble en revanche simplifié chez les amphibiens urodèles chez lesquels le territoire équivalent au sac vitellin pourrait contribuer à la fois à l'hématopoïèse primitive et définitive. Des expériences de xénotransplantation de ce territoire entre embryons d'amphibiens urodèles d'espèces dif-

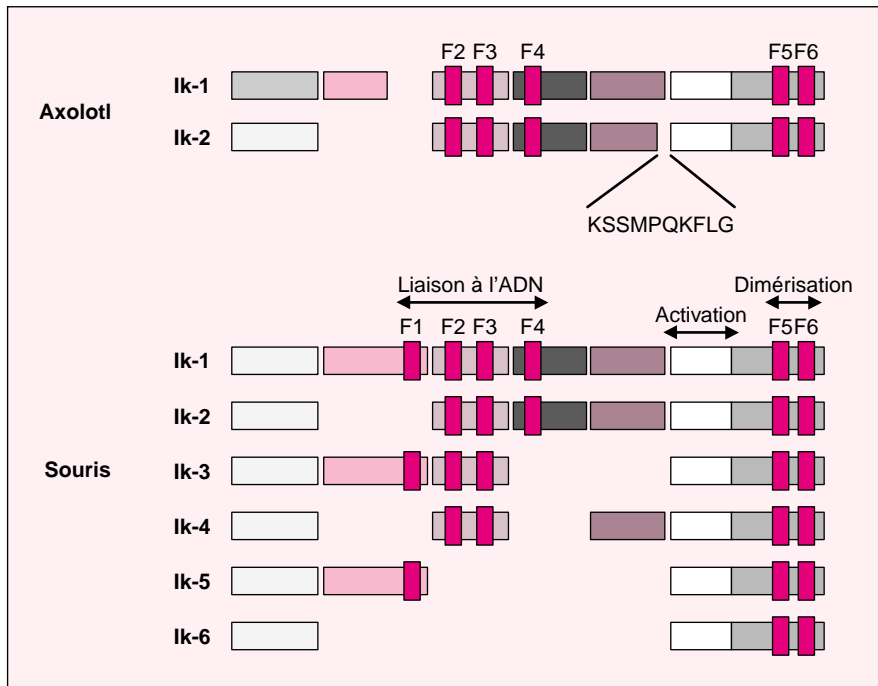


Figure 3. Représentation schématique des isoformes Ikaros chez l'axolotl et chez la souris. Les doigts de zinc (F1 à F6, en rouge) et les domaines de liaison à l'ADN, d'activation et de dimérisation sont indiqués. Les exons 1 et 2 sont regroupés dans le même rectangle gris. L'isoforme Ik-1 d'axolotl présente une délétion d'environ 96 pb comprenant le premier doigt de zinc F1. L'exon 3 est totalement absent dans l'isoforme Ik-2 et, de ce fait, les isoformes Ik-1 et Ik-2 chez l'axolotl présentent le même nombre de doigts de zinc. On note également la délétion d'un décapeptide (KSSMPQKFLG) correspondant aux 9 acides aminés C-terminaux codés par l'exon 7 et au 1^{er} acide aminé amino-terminal codé par l'exon 7. Cette délétion est retrouvée notamment au niveau de certaines isoformes Ikaros dans le cas de leucémies humaines aiguës lymphoblastiques LAL (schéma modifié d'après [22]).

férentes devraient permettre de confirmer ces observations et d'analyser *in vivo* le rôle des VBI dans la genèse des différentes lignées sanguines ■

Charles Durand

Laboratoire d'hématopoïèse moléculaire, Inserm U. 474, Hôpital Port-Royal, 123, bd Port-Royal, 75014 Paris, France.

Jacques Charlemagne

Julien Fellah

Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire du développement, Équipe d'immunologie comparée, Université Paris VI, CNRS UMR 7622, 9, quai Saint-Bernard, 75005 Paris, France.

RÉFÉRENCES

- Johnson GR, Moore MA. Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature* 1975; 258: 726-8.
- Moore MA, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 1970; 18: 279-96.
- Dieterlen-Lièvre F, Martin C. Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev Biol* 1981; 88: 180-91.
- Cumano A, Dieterlen-Lièvre F, Godin I. Lymphoid potential, probed before circulation, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 1996; 86: 907-16.
- Medvinsky AL, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996; 86: 897-906.
- Cortés F, Labastie MC. Contrôle moléculaire du développement du système hématopoïétique chez les vertébrés. *Med Sci* 2000; 2: 198-204.
- Dale L, Howes G, Price BM, Smith JC. Bone Morphogenetic Protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* 1992; 115: 573-85.
- Jones CM, Lyons KM, Lapan PM, Wright CV, Hogan BL. DAR-4 (Bone Morphogenetic Protein 4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Development* 1992; 115: 639-47.
- Maeno M, Ong CL, Suzuki A, Ueno N, Kung HF. A truncated bone morphogenetic protein 4 receptor alters the fate of ventral mesoderm to dorsal mesoderm: roles of animal pole tissue in the development of ventral mesoderm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10260-4.
- Suzuki A, Thies RS, Yamaji N, et al. A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10255-9.
- Huber TL, Zon LI. Transcriptional regulation of blood formation during *Xenopus* development. *Sem Immunol* 1998; 10: 103-9.
- Turpen JB, Kelley CM, Mead PE, Zon LI. Bipotential primitive-definitive hematopoietic progenitors in the vertebrate embryo. *Immunity* 1997; 7: 525-34.
- Tracey WD, Pepling ME, Horb ME, Thomsen GH, Gergen JP. A *Xenopus* homologue of aml-1 reveals unexpected patterning mechanisms leading to the formation of embryonic blood. *Development* 1998; 125: 1371-80.
- Lane MC, Smith WC. The origin of primitive blood in *Xenopus*: implications for axial patterning. *Development* 1999; 126: 423-34.
- Ciau-Uitz A, Walmsley M, Patient R. Distinct origins of adult and embryonic blood in *Xenopus*. *Cell* 2000; 102: 787-96.
- Deparis P, Jaylet A. The role of endoderm in blood cell ontogeny in the newt *Pleurodeles waltlii*. *J Embryol Exp Morph* 1984; 81: 37-47.
- Deparis P, Jaylet A. Studies on the origin of various blood cell lines in the salamander *Pleurodeles waltlii*. *J Embryol Exp Morph* 1975; 33: 665-83.
- Ducibella T. The occurrence of biochemical metamorphic events without anatomical metamorphosis in the axolotl. *Dev Biol* 1974; 38: 175-6.
- Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. An early hematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994; 371: 221-6.
- Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukemia oncoprotein tal1/SCL. *Nature* 1995; 373: 432-4.
- Mead PE, Kelley CM, Hahn PS, Piedad O, Zon LI. SCL specifies hematopoietic mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* 1998; 125: 2611-20.

RÉFÉRENCES

22. Durand C, Charlemagne J, Fellah JS. Structure and developmental expression of Ikaros in the Mexican axolotl. *Immunogenetics* 1999; 50: 336-43.
23. Georgopoulos K, Winandy S, Avitahl N. The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 155-76.
24. Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Neben S, Friedrich C, Georgopoulos K. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med* 1999; 190: 1201-13.
25. Sun L, Heerema N, Crotty L, et al. Expression of dominant-negative and mutant isoforms of the antileukemic transcription factor Ikaros in infant acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 680-5.
26. Nieuwkoop PD, Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North Holland Publishing Co, 1967.

TIRÉS À PART

C. Durand.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Une valse à... mille temps.** La transcription est toujours figurée sous la forme d'un complexe d'ARN polymérase (ARNpol) se déplaçant de façon linéaire le long d'une molécule d'ADN. La réalité est certainement plus complexe. Qu'en est-il exactement? Est-ce l'ARNpol qui se déplace, ou l'ADN, tiré par ce moteur moléculaire [1]? Schafer et al. avaient déjà observé que les ARNpol immobilisés sur une lame de verre développaient une force suffisante pour tirer des molécules d'ADN [2]. N'oublions pas toutefois que l'ADN forme une double hélice avec 10,4 paires de bases par tour, ce qui suggère fortement l'existence d'un mouvement rotatif associé. C'est ce que viennent de montrer Y. Harada et al. [3]. Le principe expérimental est simple, la réalisation certainement très difficile. La transcription de l'ADN est enclenchée *in vitro* en l'absence d'UTP, afin que l'ARNpol interrompe la transcription à la première adénine. Puis l'ARNpol est immobilisé sur une lame de verre tandis qu'une

bille magnétique est attachée à l'extrémité 3' de l'ADN. Cette bille permet, grâce à l'application d'un champ magnétique, de fixer l'ADN dans un axe vertical (comme un pendule, mais à l'envers). Toute rotation se fera donc sur un plan horizontal et pourra être visualisée au microscope en décorant la bille magnétique de toutes petites billes fluorescentes qui, si l'on regarde par le haut, auront alors un mouvement circulaire. Il ne reste plus qu'à rajouter les nucléotides tri-phosphates (NTP) pour que la transcription reprenne. Les auteurs observent qu'un petit pourcentage de billes a effectivement un mouvement circulaire qui est toujours dans le sens des aiguilles d'une montre. Ceci montre que l'ARNpol peut imposer un mouvement rotatif à l'ADN en « tirant » sur son brin droit. Jusqu'à 180 révolutions ont été observées, ce qui suggère que plusieurs milliers de paires de bases peuvent ainsi être transcrites. La vitesse maximale observée est de 0,2 révolution par seconde. La force

de torsion produite par l'ARNpol est d'au moins 5 picoNewton par nm. On observe parfois des rotations brusques dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, qui sont probablement dues (du fait des conditions expérimentales) aux forces de torsions appliquées à l'ADN. Celui-ci se « détord » alors brutalement (comme une corde tendue, fixée à une extrémité, et à laquelle on imprimerait un mouvement de torsion par l'autre extrémité). Elles sont moins fréquentes quand les concentrations de NTP sont plus élevées: en effet l'ADN est dans ce cas dans une forme super enroulée, ce qui réduit la longueur effective de la « corde » et donc la force de torsion. Reste à déterminer lequel, de l'ARNpol ou de l'ADN, tourne autour de l'autre *in vivo*.

[1. Cook PR. *Science* 1999; 284: 1790-5.]

[2. Schaefer DA, et al. *Nature* 1991; 352: 444-8.]

[3. Harada Y, et al. *Nature* 2001; 409: 113-5.]

COBIP

: