

23

# GÉNOMES

## STRUCTURES, FONCTIONS ET RÉGULATIONS

ALAIN BUCHETON

Président de la section

MICHELE MEUNIER-ROTIVAL

Rapporteur

Frédéric Barras

Joël Bégueret

Jean-Marie Blanchard

Raymond Devoret

Michel Duguet

Marie Dutreix

Bernard Dutrillaux

Janine Gaillard

Claude Gutierrez

Alain Israel

Bernard Jacq

Claude Kedinger

Andrée Lazdunski

Danièle Le Roscouet

Jean-Michel Louarn

Christine Petit

Monique Scandellari-Bras

Dominique Stehelin

David Tuil

## INTRODUCTION

Quel point commun entre l'apparition de certains cancers et l'existence de pathologies comme la trop fameuse maladie de la vache folle ? On peut les considérer comme des perversions de la régulation, qu'elle soit génétique ou épigénétique. Les diverses modalités d'expression de notre génome se déclinent à de multiples niveaux. Le flux de l'information engendré tout d'abord dans le noyau au cours de la transcription de l'ADN en ARN va ensuite passer dans le cytoplasme où le message sera interprété en terme de protéines aux activités multiples : enzymes, régulateurs géniques, éléments de structures supramoléculaires, etc. Un cancer peut ainsi résulter d'un dérèglement de la transcription ou de l'une quelconque des étapes post-transcriptionnelles qui conduisent à la maturation du message codé par certains gènes critiques (proto-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs). Toutefois, si le phénotype d'un organisme est le résultat de la confrontation de l'information génétique qu'il contient aux signaux qu'il reçoit, l'existence d'une mémoire moléculaire héritable, autre que la simple séquence nucléotidique, peut intervenir pour moduler l'expression génétique. Dans ce cas, ce n'est pas tant la séquence du gène qui va déterminer ses modalités d'expression que l'empreinte d'événements qui se sont produits antérieurement, et qui va se transmettre aux générations ulté-

rieuses. Ces phénomènes s'exercent aussi bien au niveau chromatinien – c'est entre autres ce qui rend impossible la parthénogénèse chez les mammifères – qu'au niveau protéique, et c'est ce qui se produit dans les maladies à prions.

Ce dialogue permanent entre génome et milieu externe n'est pas sans danger : en effet, le maintien de l'identité d'une espèce, de même que la prévention de l'apparition de maladies graves sont le fruit d'une lutte constante menée contre l'accumulation de mutations. Ces dernières peuvent aussi avoir une cause endogène et, à ce titre, les éléments transposables, ces courtes séquences dotées de mobilité qui représentent une large proportion de tout génome normal, sont des agents très actifs. La variabilité créée par ces processus, quand elle n'est pas endiguée, est aussi une porte ouverte à l'émergence de nouvelles espèces. Cette dynamique, aux effets apparemment opposés, est en fait sous-tendue par l'action conjuguée de systèmes enzymatiques complexes de réparation et de recombinaison de l'ADN. Les années récentes ont permis de disséquer les mécanismes moléculaires et d'isoler de nombreuses enzymes impliquées dans ces processus. Deux conclusions importantes se dégagent : tout d'abord, les voies de réparation et de recombinaison de l'ADN sont intimement liées aux processus de réplication, de transcription et de régulation du cycle cellulaire. En outre, la dissection des mécanismes de contrôle de la fidélité de la réplication permet de suivre la phylogénèse depuis les bactéries jusqu'à l'homme, et de comprendre le mécanisme moléculaire de nombreuses maladies gravissimes, y compris certains cancers.

La compréhension de l'écheveau des régulations qui se tisse au sein des organismes complexes demeure un enjeu formidable qui requiert non seulement l'intervention des techniques les plus sophistiquées de la biologie moléculaire et de la chimie structurale, mais également l'étude des systèmes modèles dont la microbiologie est si riche. En effet, il reste encore beaucoup à apprendre sur les mécanismes fondamentaux du vivant, et les micro-organismes, de par leur simplicité et le caractère parfois extrême de leurs stratégies de régulation, jettent un éclairage instructif sur les eucaryotes supérieurs.

L'analyse des génomes a connu récemment des avancées considérables. Citons l'établissement des cartes génétique, physique et bientôt génique du génome humain, ou la détermination de la séquence complète du génome de la levure et de plusieurs procaryotes. Les répertoires des gènes fournissent des outils inestimables à l'ensemble des disciplines biologiques, mais apportent aussi leur lot de surprises. Ainsi, le séquençage du génome de la levure a mis en évidence un grand nombre de gènes (gènes "orphelins") qui codent des produits dont la fonction est encore totalement inconnue.

Au travers des divers projets de séquençage de l'intégralité du génome humain qui voient le jour s'ouvre l'espoir, dans les prochaines années, de caractériser plus facilement les gènes impliqués dans des pathologies. Outre un diagnostic plus efficace des prédispositions, il devient légitime d'envisager à plus long terme une approche de thérapie génique ou cellulaire (la recherche amont sur les vecteurs est actuellement en plein essor). D'autre part, un nombre croissant de micro-organismes d'intérêt médical sont en cours de séquençage. L'ensemble du secteur de la santé sera donc profondément marqué par les retombées des programmes génomes.

L'un des défis que les biologistes doivent relever est la détermination de la fonction des gènes identifiés par ces programmes. Et c'est là que le recours à des organismes modèles sera un atout de choix. En effet, l'un des résultats les plus spectaculaires de la biologie ces dernières années a été la mise en évidence de la conservation des grandes fonctions du vivant au cours de l'évolution, non seulement pour le fonctionnement de la machinerie cellulaire de base, mais aussi aux niveaux supérieurs d'organisation des êtres vivants. Il n'est ainsi que de citer par exemple la conservation troublante de la structure et de la fonction des gènes qui dictent non seulement la mise en place des grands axes de l'embryon, mais également de certains organes. Ainsi, la plupart des gènes humains identifiés ont leur homologue dans des espèces modèles chez lesquelles leur étude pourra être entreprise. Cela suffit à justifier les programmes de séquençage du génome de ces derniers, tels – la liste n'est pas limitative – la drosophile (dont la moitié des gènes a déjà été identifiée par la génétique), le nématode

*Caenorhabditis elegans* (dont le génome est presque entièrement séquencé), ou encore la plante *Arabidopsis thaliana*.

En conclusion, la génétique et la biologie moléculaire sont les disciplines qui ont le plus marqué la biologie au cours des dernières décennies. Les progrès considérables enregistrés dans des domaines tels que la biologie cellulaire, et surtout le développement, résultent de la performance de ces méthodes d'étude et de leur application à ces différents domaines. Le développement de la génétique moléculaire révolutionnera aussi des disciplines encore plus complexes comme les neurosciences. On peut dire sans excès que la génétique et la biologie moléculaire, combinées à l'analyse systématique des génomes, constituent la base qui permet aujourd'hui le développement sans précédent des sciences du vivant.

Le texte qui suit développe ces différentes notions sous la forme de cinq chapitres qui analysent respectivement l'étude fonctionnelle des génomes, les mécanismes de la recombinaison, réplication, réparation et de la transposition, les mécanismes d'oncogenèse, en mettant plus particulièrement l'accent sur la transcription, les régulations post-transcriptionnelles et épigénétiques, et finalement, les apports plus spécifiques de la microbiologie aux grands courants actuels de la biologie.

différents états de développement et/ou d'achèvement. Pour les génomes compacts, lorsqu'ont existé des projets structurés au niveau européen ou mondial, le succès est évident, même si les stratégies ont été très différentes selon l'organisme. Deux génomes procaryotes sont aujourd'hui entièrement séquencés : il s'agit d'*Haemophilus influenzae* et de *Mycoplasma genitalium*, le plus petit génome bactérien connu (0,6 Mb), donnant une idée du contenu minimal en information nécessaire pour faire fonctionner une cellule. Plus d'une vingtaine d'autres génomes bactériens ou archaebactériens font l'objet de projets de séquençage (certains presque terminés), soit pour leur intérêt fondamental, soit pour leur importance en santé publique, soit pour leur importance écologique et économique. La grande majorité de ces projets est américaine ; Canadiens et Japonais sont également impliqués.

On attend les données complètes pour *B. subtilis* et *C. elegans*. Le séquençage de la levure de boulanger *S. cerevisiae* est terminé et accessible dans les bases de données bien que les publications ne soient parues que pour un petit nombre de chromosomes. Il a été effectué pour plus de la moitié dans la CE, par le biais de programmes européens, avec soutiens récurrents réguliers, planifiés sur plusieurs années, et dans une multitude de laboratoires de taille très variable. Leur caractéristique commune est leur expertise dans le domaine de la génétique de la levure, ce qui permettra à ces laboratoires de participer à l'après-séquence (voir plus loin). Le deuxième exemple est celui de *C. elegans* dont la séquence va être achevée par des "genome centers" spécialisés dans le "très grand séquençage" (deux centres anglo-saxons).

Lorsqu'au contraire, aucun projet n'a été mis en place, la séquence n'est pas terminée même si la taille du génome est "modeste" comme celle d'*E. coli*. Enfin, pour être l'exception qui confirme la règle, citons l'exemple récent de ce centre "régional" et non académique japonais qui a séquencé en moins d'un an le génome entier d'une cyanobactérie de 3,5 Mb (30 chercheurs et 30 techniciens).

La formidable moisson d'informations qui va résulter de ces programmes permettra de comprendre le fonctionnement de la cellule dans sa globalité : intégration de l'activité sensorielle, de

## 1 - ANALYSE FONCTIONNELLE DES GÉNOMES

### 1. 1 PROJETS "GÉNOMES"

Les projets de séquençage concernant les génomes modèles (*Escherichia coli* 4,2 mégabases : 4 Mb, *Bacillus subtilis* 4,7 Mb, *Saccharomyces cerevisiae* 13 Mb, *Caenorhabditis elegans* 100 Mb, *Arabidopsis thaliana* 100 Mb, *Drosophila melanogaster* 165 Mb, *Homo sapiens* 3000 Mb) sont à

l'activité de transport, des réseaux de régulations majeurs, du contrôle des flux d'énergie, etc., elle permettra également des comparaisons intéressantes, pas seulement en termes de phylogénie moléculaire, mais aussi d'évolution des fonctions cellulaires dans divers micro-organismes en relation avec leur mode de vie. Cette masse d'informations devra être ordonnée et exploitée. On peut donc prévoir qu'un développement important de la bio-informatique sera nécessaire.

Pour les génomes eucaryotes complexes, dont les génomes de mammifères (souris, rat, chien, porc, bœuf et mouton) et le génome humain en particulier, la situation est autre. En premier lieu, a été visé l'établissement des cartes génétique et physique avec une précision croissante. Dans le cas du génome humain, rappelons les avancées dues aux équipes françaises soutenues par les grandes fondations telles que l'AFM, le CEPH et le Généthon. Les principales données ont été la définition de collections très importantes de marqueurs microsatellites répartis sur tout le génome humain, localisés sur les contigs de clones dans des chromosomes artificiels de levure (YAC) et, plus récemment, les étiquettes séquencées transcrtes (EST). Maintenant les hybrides d'irradiation servent également à l'établissement d'une carte des gènes.

Les avancées ont été conséquentes pour le génome humain où le financement est plus facile à trouver, alors que la carte physique du mammifère modèle dont la génétique est très avancée (souris) est dans un état plus rudimentaire. Le projet de séquençage du génome humain (on n'en connaît actuellement que 2 %) est sérieusement à l'étude dans plusieurs grands centres mondiaux qui sont en train de démontrer sa faisabilité sur des régions d'intérêt (par exemple le séquençage de la région critique du syndrome de Down au Japon). Les choix stratégiques (nombre de centres, méthodes, technologies, nature des échantillons, précision de la séquence) n'ont pas encore été faits. Le projet de centre de très grand séquençage en France a suscité des avis très contrastés dans la communauté. Sa création vient d'être annoncée et devrait permettre à la France de ne pas perdre pied dans ce domaine.

En amont, une recherche en informatique appliquée aux problèmes de la biologie doit être

encouragée avec le développement du dialogue entre biologistes et informaticiens. En plus des données gigantesques qu'il faut se préparer à recevoir, organiser, mettre à jour et distribuer (on parle de 1000 gigaoctets en l'an 2000), de nouveaux outils et logiciels adaptés à la comparaison de séquences et à la prédition des structures à partir de ces séquences devront être développés, ainsi que de nouvelles bases permettant la modélisation et la prédition des fonctions et régulations. En effet, les génomes modèles compacts serviront de prototypes pour l'analyse des grandes fonctions. Le séquençage des génomes eucaryotes permettra l'analyse de leur organisation globale (organisation des chromosomes et plus particulièrement des structures et des éléments chromatiniens, rôle des séquences répétées, groupement des gènes, répartition des séquences, etc.). Les études sur l'évolution bénéfieront des programmes de séquençage, pourvu qu'on leur ajoute le séquençage (en totalité ou en parties) des génomes d'autres espèces judicieusement choisies.

## 1. 2 L'APRES-SÉQUENÇAGE ET/OU L'ANALYSE FONCTIONNELLE

Plusieurs stratégies sont possibles pour "l'après-séquençage" : partir des grandes fonctions pour rechercher les gènes, ou exploiter les données de séquence pour rechercher la fonction. C'est actuellement cette dernière voie qui est exploitée.

En effet, dans le cas des génomes compacts, les avancées significatives apportées par le séquençage systématique portent sur la découverte d'un nombre important de gènes de fonction inconnue (gènes orphelins). Il faut maintenant proposer des méthodes permettant une approche globale d'analyse fonctionnelle de ces gènes. L'analyse fonctionnelle de gènes d'*E. coli*, *B. subtilis* et *S. cerevisiae* (programme EUROFAN) est commencée afin de valider les méthodes d'analyse globale. D'une manière générale, le schéma est le même : organisation des ressources (construction systématique de collections de mutants et distribution) et utilisation de ces mutants pour déterminer la fonction des gènes par l'analyse de leur phénotype (dans différents milieux, à différents moments du cycle

notamment en construisant des cartes 2D du contenu protéique), ou bien étude de l'expression des gènes en construisant des banques d'ADNc (déposées à haute densité sur membranes par des robots), etc.

Pour la drosophile, près de la moitié des gènes a déjà été identifiée par la génétique moléculaire. Un projet de séquençage a commencé aux États-Unis, et un autre débute au niveau de la CE. L'existence de collections d'insertions de l'élément transposable P régulièrement réparties sur l'ensemble du génome permet d'envisager l'étude des phénotypes mutants de la plupart des gènes identifiés par le séquençage.

Dans les cas du génome du nématode, du génome humain (projet TIGR, Merck et Genexpress) et de celui de la souris, le catalogue des gènes est abordé par l'analyse systématique des capacités codantes des génomes *via* les banques d'expression. Les étiquettes séquencées transcrites (EST) sont de plus en plus nombreuses dans les banques de données et elles doivent être organisées et regroupées. La construction de cartes transcriptionnelles nécessitera la localisation de ces marqueurs géniques sur la carte physique, devenant alors un outil pour le clonage positionnel.

Donner la liste ne signifie pas donner la fonction. Ces EST sont classées en différentes catégories selon que l'on peut les rattacher à des gènes connus, ou qu'elles sont apparentées, ou qu'elles comportent seulement des motifs connus. La fonction des gènes orphelins demandera des investissements considérables et l'utilisation d'organismes modèles tels que la levure, la drosophile, le nématode, le poisson-zèbre, la souris, etc. Parmi les stratégies actuellement définies, citons l'invalidation des gènes (knock out), la transgenèse par addition de gènes ou modification de gènes résidents (remplacement par une version mutée), la création de délétions génomiques à volonté (en utilisant par exemple le système *cre-lox*), l'analyse massive de l'expression par l'analyse *in situ*, la transgenèse de fragments génomiques de plus en plus grands (dans des BAC, PAC, YAC) pouvant permettre l'utilisation de tests de complémentation. D'une manière générale, l'analyse comparée de fonctions et de systèmes de régulation et d'organogenèse fera

également avancer les connaissances. La pluridisciplinarité est nécessaire, et la demande est forte pour des compétences très variées, notamment des connaissances très structurées en biochimie, en physiologie, dans les sciences du développement, de l'évolution, en génétique des populations, etc.

### **1. 3 LES MALADIES GÉNÉTIQUES (MALADIES HÉRÉDITAIRES, GÉNÉTIQUE DES CANCERS, GÉNÉTIQUE MÉDICALE)**

La recherche des gènes impliqués dans les maladies monogéniques et polygéniques est en cours, que ce soit des maladies du développement, du système nerveux, de la réparation, du métabolisme ...

Ceci n'a été possible que grâce à la mise en place des marqueurs de polymorphisme développés au Généthon et n'est faisable qu'avec un soutien logistique important. Il est intéressant de noter la compilation récente montrant que 51 gènes responsables de maladies génétiques humaines ont été trouvés par clonage positionnel (13/51, soit 25 %, correspondent à des gènes connus et étudiés chez la levure). Trouver le ou les gènes responsable(s) ne conduit pas nécessairement à expliquer par quel mécanisme le défaut génétique conduit à la maladie. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire d'avoir une démarche pluridisciplinaire, et notamment biochimique. Il est utile d'avoir des modèles animaux. La souris est le modèle de choix (mais non exclusif) par sa petite taille, sa reproduction rapide et surtout sa génétique, sans parler de la similitude qui existe entre les chromosomes de la souris et de l'homme. Des modèles animaux plus proches de l'homme pourraient être nécessaires.

L'analyse des QTL (quantitative trait loci), celle des maladies multifactorielles à composante génétique comme les maladies cardiaques ou le diabète, la mise en évidence des gènes de prédisposition aux cancers etc., va se développer.

La mise en évidence des gènes responsables de maladies permet d'ores et déjà d'envisager leur traitement par thérapie génique. La thérapie

génique somatique – ou plus spécifiquement le traitement par transfert de gènes – est à l'étude pour des maladies monogéniques très variées ou pour certaines formes de cancer. Cela nécessite la mise au point de vecteurs, dérivés notamment de rétrovirus et d'adénovirus ou des vecteurs non virus (liposomes, etc.). C'est une recherche qui se fait parfois en partenariat avec l'industrie pharmaceutique. Les progrès de la connaissance des mécanismes de la transposition permettent également d'envisager l'utilisation des éléments transposables (des parasites des génomes) pour la thérapie génique.

## 1. 4 LES MOYENS ET LES TECHNIQUES

Les fondations et associations caritatives qui ont participé aux grandes avancées de cartographie physique et génétique du génome humain se retirent systématiquement (voir le CEPH, Généthon et AFM). La place de l'industrie n'est pas très importante pour l'instant. Dans tous les cas, il serait bon que les choix soient clairement exprimés et que soit reconnue la place de chaque partenaire académique, caritatif ou industriel.

On vient d'apprendre qu'un centre de séquençage va être créé en France. Il était temps, car le retard pris ne sera bientôt plus rattrapable. Encore faut-il choisir avec soin les génomes à séquencer et la technologie. On assiste, de par le monde, à l'émergence d'une nouvelle manière d'aborder les problèmes biologiques, avec la constitution de grands centres d'analyse systématique, par exemple des centres de séquençage pour les grands génomes, et des centres pour l'inactivation systématique chez des organismes modèles des gènes identifiés par les projets de séquençage. Il est essentiel de tenir sa place dans ces domaines. Et il est tout aussi essentiel de développer le réseau des laboratoires plus "traditionnels", dont l'activité est indispensable à la compréhension finale de cette fonction et à la résolution des problèmes biologiques de fond.

Il va exister et il existe déjà un problème de centres de ressources biologiques en France. Les banques de clones, de cellules immortalisées, de

tissus adultes et fœtaux, sains ou malades, les collections d'ADN et les outils (filtres) de criblage enfin, nécessitent des moyens financiers pour le maintien et la distribution des échantillons.

Les données de cartographie, de séquences, les bases de données spécialisées indispensables sont *in silico* et sont l'outil de travail de base de tout laboratoire. Il faut en avoir l'accès et pouvoir traiter ces données, ceci suppose la définition de standards plus précis (nomenclature, définition des objets biologiques). Pour intégrer les données provenant du séquençage, il faut développer des réseaux aux débits très accrus et des outils de visualisation et de navigation plus conviviaux.

L'accès à ces ressources informatiques dépend des capacités nationales (le Groupement d'Intérêt Scientifique Infobiogen répond à beaucoup des besoins de la communauté, encore faut-il qu'il ait des moyens à la hauteur des enjeux) et des possibilités locales.

Il est nécessaire d'avoir une liaison de qualité à l'Internet (le Groupement d'Intérêt Public Renater a été pionnier pour les centres de recherche académique et a joué un rôle essentiel). Ceci demande les compétences d'ingénieurs réseaux, nécessite le câblage des bâtiments anciens, l'achat de machines, et enfin demande un énorme travail d'enseignement et de formation puis de suivi, car l'évolution des techniques et des nouveaux outils accessibles est devenue extrêmement rapide.

Sur le plan technologique, l'imagerie sera de plus en plus utilisée, nécessitant une amélioration des logiciels pour la comparaison automatique des autoradiogrammes de gels protéiques en deux dimensions ou la lecture des gels de génotypage par microsatellites, et une amélioration de la quantification des signaux en microscopie. Il faut aussi une miniaturisation accrue de l'analyse des macromolécules, la robotisation de nombreuses étapes, sans parler de l'invention de nouvelles techniques de séquençage par exemple.

## 1. 5 LE PROGRAMME "GÉNOMES" FRANÇAIS

Le GREG a, au dire de tous, le mérite d'avoir existé ; il a permis de maintenir la recherche sur les génomes en France à un excellent niveau international, même si les avis divergent beaucoup sur son rôle incitatif et fédérateur.

Les ACC de 1995 ne sont pas reconduites sous leur forme passée et, de toute façon, la génétique médicale était particulièrement favorisée (du moins au niveau de l'appel d'offres) alors que l'étude des organismes modèles l'était moins.

Pour les chercheurs français, actuellement, en dehors des programmes européens tels que Biotech et Biomed2 terminés ou en voie de l'être, il n'existe aucun programme national incitatif et coordonnateur de moyens : "il n'existe plus de Programme Génome Français". La situation est assez paradoxale quand on voit le développement des programmes "génomes" aux États-Unis, au Japon, en Grande-Bretagne et maintenant en Allemagne, et les retombées que l'on peut en attendre.

Il ne faut en effet pas assimiler l'effort de séquençage (qui vient d'être soutenu au niveau national par la création du centre de séquençage) et un programme incitatif national portant sur les génomes, que ce soit l'étude des génomes modèles, des génomes à intérêt industriel ou thérapeutique, la génétique fondamentale, la génétique médicale, la génétique des cancers, la bioinformatique, etc.

## 1. 6 LES AUTRES CONSÉQUENCES

Les implications éthiques, légales et sociales des recherches sur les génomes – sur le génome humain et les maladies génétiques en particulier – doivent aussi faire l'objet de recherche.

Enfin, il faut noter l'effet de mode et la médiation intense qui entourent la génétique médicale. Les causes en sont évidentes. Les conséquences les plus visibles sont le déplacement d'intérêt des étudiants (la génétique humaine, en particulier le clo-

nage positionnel et la thérapie génique, attirent très fortement les étudiants en médecine et en sciences) et même la modification des programmes de formation. Les crédits récoltés par les associations caritatives sont susceptibles d'orienter les programmes de recherche.

## 2 - RÉPARATION, RECOMBINAISON, RÉPLICATION ET TRANSPOSITION

La réparation, la recombinaison, la réplication et la transposition contribuent au maintien de l'intégrité du génome et à sa propagation fidèle, tout en permettant une variabilité nécessaire à l'évolution des espèces. Sous une forme immédiatement perceptible, des anomalies de ces processus sont révélées par l'apparition de nombreuses pathologies humaines.

### 2. 1 RECOMBINAISON, RÉPARATION ET RÉPLICATION

La recombinaison et la réparation sont deux activités cellulaires étroitement associées à la réplication ainsi qu'à la transcription. Les exemples qui suivent montrent que les processus de réplication, réparation et recombinaison sont intimement associés de manière simultanée ou séquentielle. Ainsi :

- la réplication est génératrice d'erreurs de fidélité qui sont réparées par la voie de réparation des mésappariements,

- ce système de réparation contrôle lui-même la recombinaison en prévenant les échanges entre séquences d'ADN non identiques,

- la persistance de dommages sur l'ADN, en bloquant la réplication, induit (ou permet) les fonctions de réparation et de recombinaison,

- le blocage de la transcription par les lésions de l'ADN entraîne une étape de réparation préférentielle qui est liée à la présence d'enzymes de réparation dans les complexes de transcription,

- tous ces processus impliquent une resynthèse de l'ADN dont les acteurs et leur régulation restent encore à préciser.

Toutes ces relations ont pu être démontrées grâce aux approches simultanées utilisant la génétique, la biologie moléculaire et la biochimie.

### Complexité des systèmes enzymatiques

De nombreuses protéines sont communes aux trois mécanismes. Cette intrication des processus se retrouve au niveau des systèmes enzymatiques. Les réactions impliquées s'exercent au niveau d'un substrat macromoléculaire constitué, au départ, par l'ADN bicatenaire. L'un des traits communs de ces réactions est la participation de nombreuses enzymes, dont les ADN et ARN polyméras, nucléases, hélicases et topoisoméras. Certains états intermédiaires dans ces réactions sont communs : l'ADN monocaténaire en est un exemple typique. Ainsi, la réplication de l'ADN est amorcée aux origines de réplication par la formation transitoire d'ADN monocaténaire, l'ensemble des systèmes de réparation par excision resynthèse procède par une dégradation d'un brin d'ADN suivi de (ou associé à) sa resynthèse. Enfin, la production d'ADN simple brin sur lequel se fixe la protéine recA initie la recherche d'homologie durant la recombinaison. Par conséquent, les enzymes capables de former l'ADN monocaténaire ou les protéines ayant une affinité pour celui-ci peuvent participer à chacun de ces mécanismes. Un autre facteur jouant certainement un rôle important est la structure topologique de l'ADN, à laquelle participent les topoisoméras et d'autres protéines chromosomiques, en particulier les protéines de type histone. De fait, la recombinaison homologue, la recombinaison site-spécifique, l'initiation de la réplication et probablement la réparation préférentielle, dépendent respectivement de la superhélicité de l'ADN, de sa courbure, ou des deux.

L'étude *in vitro* de la réplication par les groupes de Kornberg et de Stillman a illustré la complexité des systèmes protéiques impliqués dans cette réaction et la nécessité de rechercher chacun des éléments protéiques (ainsi que leur modification post-traductionnelle) qui participent à ces complexes afin de les reconstituer *in vitro*. Des études *in vivo* montrent qu'à cette complexité, qui se retrouve aussi dans les systèmes enzymatiques de réparation et de recombinaison, s'ajoutent les problèmes de transport, de stabilité, d'intégration avec les autres fonctions dans la cellule (telles que la transcription) et de coordination avec le cycle cellulaire.

Les trois dernières années ont permis de montrer clairement une association étroite entre réparation de l'ADN, au sens large du terme, et transcription de l'ARN, du fait de l'existence de protéines communes aux deux mécanismes et de maladies dans lesquelles ces deux voies cellulaires peuvent être altérées indépendamment ou non. Cette démonstration a permis d'expliquer le phénomène de réparation préférentielle du brin transcrit connu depuis une décennie.

De l'étude de la phylogénie des génomes à l'analyse enzymatique des réactions de réparation et recombinaison, il apparaît que les processus de réparation de l'ADN, en inhibant la recombinaison homologue, contribuent à la stabilisation des grands remaniements du génome, tandis que les étapes de mutagénèse produisent l'effet inverse.

### Conservation évolutive et diversification des protéines de réparation, de réplication et de recombinaison

La conservation, des procaryotes aux mammifères, des séquences (des gènes) des protéines du système de réparation des mésappariements a permis l'isolement en quelques mois de sept gènes humains susceptibles de participer à cette voie de réparation. Ce travail a eu d'autant plus d'impact que le système de réparation des mésappariements ou des lésions de l'ADN qui intervient dans la fidélité de la réplication et le contrôle de la recombinaison paraît être altéré dans un grand nombre de

cancers. La progression fulgurante de ce travail est due à l' excellente connaissance d'un tel système chez les bactéries et les levures, mais aussi à l'existence de malades mutés sur ces gènes de réparation. Plusieurs laboratoires français ont fortement contribué à la mise en évidence de ces mécanismes. Particulièrement intéressante est la multiplication et la spécialisation des systèmes de la bactéries aux eucaryotes : ainsi les gènes bactériens *recA* et *mutS* ont, chacun, au moins quatre gènes homologues chez la levure.

## Perspectives

Il nous faut intégrer nos connaissances dans une vision plus globale de la cellule. En effet, l'étude des mécanismes régulateurs du cycle cellulaire intéresse aussi bien les domaines de la réplication que ceux de la réparation et de la recombinaison. De la bactéries à l'homme, l'accumulation des lésions dans l'ADN (quelle que soit leur origine) s'accompagne d'un blocage de la division cellulaire caractérisé par un arrêt à des phases précises du cycle. Par exemple chez *S. cerevisiae*, les produits des gènes *RAD9* et *RAD24* bloquent les cellules en phase G1. Des analyses génétiques récentes montrent que des mutations des ADN polymérasées delta et epsilon – indispensables à la réplication du génome des levures – peuvent bloquer l'induction des protéines de réparation ainsi que mettre hors circuit certains points de contrôle du cycle cellulaire. De façon analogue, chez les mammifères, une cascade d'événements contrôlés par la protéine p53 provoque un blocage du cycle cellulaire en G1 en réponse à l'endommagement de l'ADN. Ce blocage permettrait la réparation des lésions de l'ADN afin d'assurer une réplication fidèle et complète. L'absence d'un tel blocage se traduit par l'apparition de maladies humaines graves.

Certaines étapes de la recombinaison paraissent nécessaires au contrôle de la partition des chromosomes lors de la méiose chez la levure. C'est également durant la méiose que des événements "accidentels" de recombinaison et de réplication vont provoquer l'expansion des courtes séquences répétées, responsables de plusieurs pathologies lourdes chez l'homme. L'origine de tels événements

et la capacité des cellules à les réparer sont l'objet de recherches intensives.

Les connaissances acquises devraient permettre de nombreux développements dans :

- la défense contre l'adaptation des parasites et des virus en développant et utilisant des inhibiteurs de réplication et de recombinaison,

- la prévention et le traitement des cancers grâce à une meilleure connaissance des systèmes de réparation et de réplication,

- le dépistage de prédispositions génétiques au cancer et aux maladies liées à l'instabilité des génomes,

- le dépistage d'agents mutateurs et cancérogènes par l'amélioration des tests du type Mutatest, Chromotest et test de Ames,

- la mise au point de nouvelles techniques et l'amélioration des techniques existantes : séquençage de l'ADN, PCR, thérapie génique, construction de modèles animaux

## 2. 2 LES ÉLÉMENS TRANSPOSABLES

Les éléments transposables représentent probablement les plus petits "êtres vivants", définis comme "unités de réplication qui se comportent de façon autonome vis-à-vis de la sélection naturelle". Sous sa forme la plus simple, un transposon est constitué d'un seul gène, souvent flanqué de séquences répétées. Ce gène code une enzyme de "recombinaison illégitime" qui assure sa dissémination à l'intérieur du génome des espèces qu'il parasite. La capacité de transposition réplicative de ces éléments suffit à expliquer qu'ils occupent une part importante de la plupart des génomes : par exemple, l'élément L1 constitue, à lui seul, 10 % du génome humain, et sa transposition y cause des mutations associées à des maladies.

## Éléments transposables et plasticité des génomes

La présence et/ou l'activité des éléments transposables jouent un rôle capital dans les remaniements génomiques de presque tous les organismes. Chez les bactéries, les séquences d'insertion (IS) permettent la mobilité de caractères tels que résistances aux agents anti-bactériens, déterminants du catabolisme des xénobiotiques, et déterminants de la pathogénicité. Chez les mammifères, les altérations induites par les éléments transposables peuvent conduire à des modifications notables du programme génétique de leur cellule hôte, pouvant être liées à l'apparition de cancers, ainsi qu'à de multiples autres désordres.

Il a été également récemment mis en évidence que certains éléments transposables peuvent être indispensables à leur hôte. Ainsi, des éléments transposables, appartenant à la classe des rétrotransposons sans répétitions terminales longues (LTR), assurent l'intégrité des télomères chez les diptères.

## Différents types d'éléments transposables et mécanismes de transposition

Les éléments transposables se subdivisent en deux grands groupes selon la stratégie utilisée dans leur transposition. Les éléments du premier groupe, qualifiés de "type bactérien" (bien qu'ils existent dans des organismes procaryotes et eucaryotes), expriment au moins une protéine, la transposase, capable de reconnaître les extrémités de son élément, de les cliver, et de les transférer à un autre site du génome. Les éléments du second groupe, appelés rétroéléments (ou rétrotransposons), utilisent un intermédiaire ARN dans la première étape de leur cycle de rétrotransposition. Les rétrovirus appartiennent à ce groupe. L'ARN, transcrit à partir de l'élément intégré (appelé provirus dans le cas des rétrovirus), est converti en ADN bicaténaire et linéaire par une polymérase virale codée par l'élément, la transcriptase inverse. Dans le cas des rétrovirus et des rétrotransposons à LTR, l'ADN néosynthétisé est inséré dans le génome par une autre enzyme codée par le rétroélément, l'intégrase.

En dépit des différences marquées entre ces deux stratégies de transposition, il s'avère que les réactions de coupe et de ligature réalisées par l'intégrase sont identiques à celles effectuées par les transposases des éléments de type bactérien.

Au niveau du mécanisme moléculaire de la transposition, deux processus fondamentaux, apparus successivement au cours de l'évolution des éléments transposables, se dégagent nettement :

- le mécanisme d'intégration de certains rétroéléments (les rétrotransposons sans LTR, ou LINE), directement couplé à leur transcription inverse, est manifestement très ancien puisqu'il assure, par exemple, le "homing" des introns de type II, vestiges du "RNA world" ;

- les diverses intégrases à ADN suivent toutes les règles de base du fonctionnement de la recombinaison illégitime chez les procaryotes. Ce mécanisme d'intégration a même été adopté par les plus évolués des rétroéléments (les rétrotransposons à LTR et les rétrovirus) chez qui transcription inverse et intégration de la copie ADN sont deux mécanismes moléculairement distincts.

## Régulation de la transposition

Chez la drosophile, l'étude des divers mécanismes qui empêchent l'élément P, un transposon de type bactérien, de "dépasser les bornes", ont apporté d'importantes informations à la fois sur l'élément lui-même et sur son hôte. Ces mécanismes incluent : une répression transcriptionnelle de l'élément par quelques éléments P défectifs ; une répression de l'épissage dans les tissus somatiques ; la participation d'autres éléments, encore capables, bien que défectifs, de produire du répresseur ou simplement de titrer la transposase.

L'étude du facteur I de la drosophile - un rétrotransposon sans LTR - devrait aussi apporter, dans un futur proche, d'intéressantes informations sur les mécanismes qui limitent la transposition.

Dans certains cas, il a été montré que les fréquences de transposition sont régulées par des gènes de l'hôte (par exemple pour le rétroélément

gypsy de la drosophile), ce qui situe directement la régulation des éléments transposables dans le cadre général de l'étude des relations hôte/parasite. Les transposons peuvent utiliser les circuits de régulation de leur hôte, nous permettant ainsi de découvrir ces circuits. C'est le cas des processus de différenciation cellulaire qui limitent leur expression à certains tissus (par exemple à la lignée germinale qui assure leur propagation).

### Utilisation des éléments transposables

En ce qui concerne la transgenèse, on ressent un besoin pressant de vecteurs utilisables notamment chez divers invertébrés présentant un intérêt agronomique ou médical. Rappelons que la performance de la génétique moléculaire chez la drosophile est très largement basée sur l'utilisation d'un élément transposable, l'élément P. Des succès enregistrés récemment, soit avec des transposons de type bactérien (l'élément Minos utilisé chez des insectes nuisibles aux cultures), soit avec des rétrovirus (le rétrovirus de Moloney enveloppé par la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire utilisé chez le poisson-zèbre et des bivalves) augurent favorablement de la transformation d'autres organismes importants comme le moustique ou le ver à soie. Enfin, la découverte récente de rétrovirus chez les invertébrés (gypsy chez la drosophile) permet d'envisager le développement de vecteurs rétroviraux spécialement destinés aux insectes. Il est aussi possible d'espérer développer de nouvelles stratégies de thérapie génique chez l'être humain par utilisation des éléments transposables.

## 2. 3 ORGANISATION DE LA COMMUNAUTÉ : UN PÔLE IMPORTANT DE LA GÉNÉTIQUE EN FRANCE

### Réparation, recombinaison et réplication

Trois clubs indépendants se sont constitués et organisent des réunions régulières et indépendantes pour chaque thème. Tous les deux ans, un colloque

commun (colloque des 3R) regroupant plus de 300 personnes est organisé. Le congrès international des mutagènes de l'environnement qui se tient tous les quatre ans dans un pays étranger sera organisé en France en 1997. De nombreuses conférences internationales sont régulièrement organisées sur ces sujets.

### Transposition

Tous les deux mois, une réunion est organisée entre les laboratoires "éléments transposables" de la région parisienne. Chaque année, une réunion nationale regroupe près de 150 personnes des différents laboratoires français. Des conférences internationales sont régulièrement organisées. Au niveau européen, la France est un pays leader qui regroupe un grand nombre de chercheurs travaillant dans ces domaines et qui a contribué efficacement à la plupart des découvertes citées ci-dessus.

## 3 - TRANSCRIPTION ET ONCOGENÈSE

L'une des caractéristiques majeures des progrès faits ces dernières années dans le domaine de l'oncogenèse est très certainement le rapprochement de champs thématiques qui s'ignoraient plus ou moins comme l'oncologie, le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. L'exposé qui suit se cantonne à la transcription, et les divisions introduites – que certains d'entre vous pourraient trouver arbitraires – ne sont là que pour mettre en exergue les divers courants que l'on peut discerner dans ce domaine. Ainsi, si l'on prend pour exemple le cas des gènes suppresseurs de tumeurs, leur découverte est à mettre sur le compte de travaux réalisés aussi bien dans le cadre des virus oncogènes à ADN que dans celui de la cytogénétique et du clonage positionnel.

### 3. 1 ONCOGÈNES ET SIGNALISATION

Les travaux sur les rétrovirus oncogéniques ont conduit à l'idée que la plupart des oncogènes découverts à ce jour interviennent dans l'une des grandes voies de transmission des signaux de prolifération ou de différenciation.

En effet, les protéines oncogéniques nucléaires (membres des familles des protéines Myc, Myb, Fos, Jun, Ski, Abl, eErbA, NFkB/Rel, Ets par exemple) constituent autant de relais transcriptionnels potentiels dans la transmission des signaux qui prennent naissance dans la membrane plasmique ou dans le cytoplasme. La compréhension de l'écheveau des régulations qui se tisse autour des gènes qui les codent demeure un enjeu important.

La duplication de l'ADN qui suit la stimulation de cellules quiescentes par des facteurs de croissance est précédée par une cascade de processus moléculaires mettant en jeu un ensemble de gènes qualifiés de précoces, comme les gènes *c-fos*, *c-jun* ou *c-myc*. Un grand nombre de ces gènes, comme nous l'avons mentionné plus haut, codent des facteurs de transcription qui sont à leur tour impliqués dans l'induction de nouvelles vagues de transcription. Ceci conduit tout naturellement à la recherche de liens fonctionnels entre gènes précoces et gènes exprimés plus tardivement dans le cycle cellulaire. Ces régulations en cascade sont orchestrées par une famille grandissante de protéines-kinases qui sont là pour relayer aussi bien l'action de facteurs de croissance que d'agents physiques ou chimiques générateurs de stress cellulaires. L'analyse des mécanismes (détermination des substrats et des gènes cibles) et leur validation *in vivo* restent dans la plupart des cas à faire.

### 3. 2 ONCOGÈNES ET CYCLE CELLULAIRE

Les oncoprotéines de plusieurs virus tumorigènes à ADN (SV40, virus des adénomes, polyomes et papillomes) sont capables de dissocier des com-

plexes protéiques cellulaires qui contiennent des régulateurs du cycle de division cellulaire, parmi lesquels l'on retrouve plusieurs suppresseurs de tumeurs. Le pouvoir transformant de ces protéines virales est lié à cette propriété de détourner les régulateurs de leur fonction première.

Le déroulement correct du cycle cellulaire est, là aussi, sous la dépendance de la formation, de l'activation et finalement de l'inactivation séquentielles d'une famille de protéine-kinases. Ces dernières, sous leurs formes associées aux cyclines (qui doivent leur nom à ce que ce sont des protéines dégradées de façon cyclique), sont soumises à un jeu de régulations positives et négatives qui, au niveau de points de contrôle spécifiques, ne permettent le passage de la cellule d'une phase à l'autre du cycle cellulaire que si certains événements sont réalisés. La progression dans le cycle cellulaire peut également être influencée par des facteurs exogènes aussi divers que par exemple le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), l'ancrage dans la matrice extracellulaire, ou encore l'introduction de lésions dans l'ADN. Dans tous ces cas, des observations récentes suggèrent l'intervention de protéines comme p53, inhibitrices du cycle cellulaire, qui agissent comme des médiateurs couplant le fonctionnement des divers points de contrôle dont la cellule s'est dotée aux principales voies de signalisation. Leur dysfonctionnement est impliqué dans un nombre grandissant de néoplasies. La pierre angulaire de cette régulation est la famille des activateurs transcriptionnels E2F. Ces facteurs de transcription sont retrouvés associés non seulement à des complexes kinases/cyclines, mais aussi aux protéines apparentées au produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome (pRb, p130, p107). Il est maintenant bien accepté que ces protéines inhibent la transcription sous contrôle des E2F en les séquestrant sous forme de complexes inactifs. La recherche des gènes cibles est, à l'heure actuelle, un enjeu important : des sites présumptifs sont présents dans de nombreux gènes dont les produits sont requis pour le passage dans la phase duplicative du cycle de division cellulaire (enzymes de la réplication, proto-oncogènes, effecteurs du cycle cellulaire, ...). Qu'en est-il *in vivo* ?

### 3. 3 ONCOGÈNES ET DIFFÉRENCIATION

Si les rétrovirus ont apporté leur moisson de paradigmes et sont actuellement devenus des outils puissants pour interférer avec certaines voies de différenciation, un grand nombre de proto-oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (particulièrement chez l'homme) ont été découverts par l'analyse des anomalies chromosomiques (amplifications, mutations, remaniements chromosomiques). C'est en effet une propriété remarquable de la cellule tumorale que d'être le siège d'une intense instabilité génomique. Les leucémies ont été à ce titre (et continuent de l'être) une manne très utile, et constituent un modèle remarquable pour comprendre les processus de différenciation qui opèrent sur plusieurs lignages cellulaires. De très nombreux facteurs de transcription se trouvent ainsi juxtaposés à des séquences ectopiques qui, soit les mutilent (élimination d'un domaine régulateur, gain d'une séquence, avec pour résultat de nouvelles propriétés), soit les font échapper à la tutelle d'éléments de contrôle (proximité d'un élément régulateur fort). La conséquence : une expression ectopique ou anachronique qui conduit à un blocage dans une impasse de la différenciation associé à une amplification incontrôlée du nombre de cellules. Peut-être, à ce propos, assisterons-nous à la caractérisation de l'une des dernières *terra incognita* nucléaires : "nuclear bodies" ou encore "POD" (pour : Promyelocytic Leukemia (PML) Oncogenic Domain), structures subnucléaires dont la fonction est totalement inconnue, mais qui sont le siège de remaniements profonds au cours de la transformation oncogénique. Les tumeurs solides, bien que plus difficiles à étudier, ont également apporté leurs contributions : nous citerons pour exemple les sarcomes d'Ewing (gènes *fli-1*, *erg*, *ETV1*), ou encore les cancers héréditaires du sein (gènes *BRCA1* et *BRCA2*).

### 3. 4 ONCOGÈNES ET APOTOSE

Le fonctionnement correct d'un organisme complexe requiert un contrôle strict de la taille des populations cellulaires qui constituent ses différents

tissus. Ceci résulte d'un équilibre judicieux entre les processus qui gouvernent la prolifération et ceux qui déclenchent la mort cellulaire. Cette dernière, aussi appelée apoptose, est un processus physiologique actif qui semble être constitutif dans toutes les cellules des eucaryotes supérieurs, la survie d'une cellule n'étant assurée que par la répression constante de la machinerie apoptotique. Ainsi l'expression forcée dans des cellules quiescentes d'oncogènes nucléaires comme *c-myc*, tout en stimulant leur entrée dans le cycle cellulaire, provoque également une mort abondante qui peut emporter toute la population si des facteurs de survie ne sont pas présents. Il semblerait donc que le pouvoir transformant de multiples oncogènes ne se révèle que dans des conditions où l'apoptose est inhibée. La sensibilité à de nombreux agents génotoxiques serait, au moins en partie, relayée par le produit du gène suppresseur de tumeurs *p53* qui est un des acteurs importants dans le contrôle de l'apoptose. La perte de *p53* au cours de la progression tumorale est en bonne corrélation avec la résistance acquise par la cellule aux multiples traitements utilisés en thérapie antitumorale.

### 3. 5 ONCOGÈNES ET RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE : UNE PERSPECTIVE

Il n'est pas possible de dissocier les progrès faits dans ce domaine de ceux obtenus dans celui de la compréhension des mécanismes généraux de la transcription. Ces progrès ont été rendus possibles notamment grâce à l'essor pris par toutes les techniques visant à mettre en évidence des interactions protéines-protéines et ADN-protéines (co-immunoprecipitation ou GST/pull down, simple et double-hybride, ...). Ces méthodes n'ont pas fini de servir, et il sera sans doute opportun de les affiner encore davantage (triple-hybride, double-hybride dans les cellules de mammifères, etc.).

Après une longue période de recherche dédiée à la caractérisation des divers partenaires impliqués dans la transcription, à leur purification, à la définition de leurs interactions sélectives, le temps est venu de les replacer dans un contexte

plus global. Ainsi, de nombreux travaux visent actuellement à isoler la (les) structure(s) opérationnelle(s), capable(s) de mimer *in vitro* toutes les caractéristiques d'une transcription fidèle et efficace (holoenzyme). Aux détours de ces pérégrinations, de nombreuses surprises : pour exemple, le facteur TBP, initialement caractérisé au niveau des unités de transcription pourvues d'une boîte TATA et transcrives par l'ARN polymérase II, est maintenant reconnu comme essentiel aux trois classes d'ARN polymérasées (I, II et III) ! Le lien avec de nombreuses fonctions cellulaires a été établi, et actuellement la transcription ne peut être séparée par exemple de la réparation de l'ADN (deux sous-unités du facteur de base TFII H ont des activités hélicases) : est-ce un moyen de surveiller en permanence la partie transcrise du génome ?

Toutes les techniques qui tentent de remplacer la transcription dans un contexte qui est le plus proche d'une situation *in vivo* sont à soutenir : nous assistons ainsi à une réactualisation du rôle de la structure chromatinienne dans le contrôle de l'expression des gènes *in vivo*. Ces études ont bénéficié non seulement de la réalisation d'animaux transgéniques permettant d'exprimer un gain de fonction, mais également d'animaux où les gènes analysés ont subi des invalidations biallèles. Au caractère constitutif et limité de ces dernières, nous opposerons la possibilité, bien plus intéressante, d'une extinction ciblée et conditionnelle. C'est sans nul doute dans ce domaine un axe à privilégier.

Signalons également le rôle grandissant de l'analyse structurale avec l'étude tridimensionnelle des facteurs de transcription (domaines de liaison avec l'ADN, domaines de dimérisation, domaines activateurs). C'est non seulement une finalité de la biologie structurale, mais également un outil puissant de modélisation qui, de pair avec l'analyse des réseaux de signalisation cellulaire telle qu'elle est décrite plus haut, peut avoir des retombées dans le domaine de la cancérologie.

Finalement, et bien que cela déborde du cadre de l'oncogenèse, il y a le monde des procaryotes : l'oublier serait une grave erreur, car ce secteur reste un système de référence pour de nombreux aspects touchant à la transcription (depuis la structure des polymérasées jusqu'à la caractérisation fine, au

niveau atomique, des interactions protéines-ADN et protéines-protéines). Parmi les découvertes marquantes les plus récentes, citons l'identification d'une protéine structurellement et fonctionnellement apparentée à TBP chez les archaebactéries, ou bien la magnifique cascade de facteurs sigma intervenant au cours de la sporulation de *Bacillus subtilis*, et dont la description s'affine au fil des ans...

En conclusion, nos intérêts dans l'étude de l'oncogenèse, et plus particulièrement des facteurs de transcription oncogéniques, se sont progressivement élargis du contrôle de la prolifération vers celui de la différenciation cellulaire. Si les progrès en thérapeutique anticancéreuse engendrés par la recherche fondamentale ne semblent pas à la mesure de la formidable quantité de découvertes faites dans ce domaine, c'est que le problème est d'une complexité colossale souvent cachée par la conjonction de certains intérêts industriels, académiques et d'effets médiatiques. De nombreuses cibles potentielles sont maintenant en notre possession, le problème est de trouver les plus judicieuses. Pour cela, il reste encore à ordonner les données accumulées pendant ces deux dernières décennies en un modèle pertinent qui tiendra compte des diverses facettes évoquées plus haut. En revanche, si l'on se place sur le plan de la médecine prédictive, des progrès très importants ont été enregistrés. L'analyse des mécanismes de prédisposition à de nombreux cancers est en pleine expansion et fournit déjà, dans de nombreux cas, un outil diagnostique important. En outre, les nouvelles connexions établies avec des champs thématiques aussi divers que le cycle cellulaire, la réparation des lésions dans l'ADN ou l'apoptose, laissent espérer de nouvelles approches fondées sur l'utilisation des mécanismes cellulaires d'arrêt de la prolifération, ou encore d'autodestruction des cellules déviantes.

## 4 - RÉGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE ET CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE

### 4. 1 MODIFICATIONS ET RÉGULATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES

Les régulations post-transcriptionnelles peuvent se situer à différents niveaux du flux de l'information génétique dans la cellule : maturation des transcrits, stabilité des messagers, contrôle de la traduction et modification des protéines. Si les études sur le contrôle transcriptionnel sont les plus avancées, il apparaît de plus en plus que les événements post-transcriptionnels ont une importance qualitative et quantitative essentielle dans le fonctionnement cellulaire. De plus, un certain nombre de résultats récents : édition des ARN messagers (ARNm), prions, épissage des protéines, ARN guides issus de la maturation de certains introns, montre que ce domaine peut continuer à révéler des surprises sur les mécanismes mis en œuvre dans l'expression génétique.

Un nombre conséquent de laboratoires français ont une activité qui se situe dans ce domaine d'étude des modifications et régulations post-transcriptionnelles, principalement au niveau de la maturation et de la stabilité des transcrits. Les événements post-traductionnels sont principalement abordés dans le cadre de l'étude de la régulation de l'activité des facteurs transcriptionnels et des oncogènes, du cycle cellulaire ou du rôle des protéines chaperons.

Il existe un potentiel de chercheurs relativement important sur le métabolisme des ARN, en particulier sur les problèmes liés à l'épissage, que ce soit au niveau de l'analyse des mécanismes de base sur les modèles levure et mammifères, de l'épissage alternatif, des ARN autocatalytiques. Il

s'agit d'une thématique importante, compte tenu en particulier du rôle de l'épissage alternatif en tant que mécanisme responsable de la diversification des séquences protéiques (ayant souvent des effets biologiques antagonistes) en relation avec la différenciation cellulaire et le contrôle de l'expression génétique (voir protéines du cytosquelette, neuro-peptides, facteurs de transcription et oncogènes, etc.). Les recherches de base sur les mécanismes de l'épissage sont essentielles pour appréhender les mécanismes de l'épissage alternatif et en particulier le rôle relatif des facteurs généraux et des facteurs spécifiques. La généralité et l'importance de l'épissage alternatif dans de nombreux phénomènes biologiques méritent un effort soutenu avec comme objectif l'identification des facteurs spécifiques et l'étude de leur expression tissu-spécifique. Ceci passera peut-être par le développement d'études sur de nouveaux modèles autres que les pré-messagers des tropomyosines. Les recherches sur les ARN autoépissables permettent d'éclaircir certains aspects structuraux et catalytiques impliqués dans la maturation des ARN hétérogènes. Ils sont actuellement prolongés par l'étude de motifs nucléotidiques possédant diverses activités catalytiques (SELEX). Cette orientation peut déboucher sur des résultats importants non seulement dans le domaine de l'évolution moléculaire, mais aussi dans la définition de nouvelles approches thérapeutiques.

Les études sur la maturation des ARN ribosomiques progressent actuellement assez rapidement grâce à des approches mettant en jeu des minigènes et la caractérisation des protéines impliquées. Le rôle de certains petits ARN d'origine intronique comme guides dans la modification des ARN ribosomiques constitue une découverte récente et importante de ce domaine.

Un facteur important de la modulation de l'information génétique et éventuellement de sa régulation est l'efficacité de la traduction. Certains aspects du problème de la stabilité des ARNm et des mécanismes mis en jeu dans la dégradation de ces ARN sont étudiés en France sur des modèles bactériens et eucaryotes. Sur le modèle levure, ce problème est abordé par l'analyse du rôle du segment polyadényle sur la stabilité des ARNm et sur les relations avec l'initiation de la traduction. Ces travaux sont complémentaires des recherches en

cours sur le rôle des événements de polyadénylation et désadénylation des messagers dans les phases précoces du développement embryonnaire. Un autre élément important à prendre en considération au niveau de la régulation de la traduction, est le "capping" des messagers. Il est maintenant admis que les extrémités 3' et 5' des messagers ont un effet synergique dans l'efficacité de la traduction. Différents résultats récents révèlent en outre l'importance de la coiffe, aussi bien pour l'export nucléo-cytoplasmique de l'ARN que pour le contrôle traductionnel des ARNm au cours du développement précoce ou de l'oncogenèse.

Ces différents travaux révèlent la nécessité d'un fort investissement dans la caractérisation des protéines associées au stockage et au transit des ARN nucléaires et cytoplasmiques. Il est également nécessaire d'entreprendre une étude approfondie de l'organisation fonctionnelle du noyau. Ces deux domaines sont actuellement en cours d'exploration. Ces recherches doivent mettre en œuvre des approches multidisciplinaires de génétique moléculaire, de biologie cellulaire et de reconstitution *in vitro*.

Au niveau protéique, plusieurs aspects méritent une attention particulière. Il s'agit du déterminisme de la stabilité des protéines en relation avec une meilleure compréhension des voies de dégradation. L'importance de ces problèmes est bien illustrée par les relations existant entre pouvoir oncogénique et stabilité des protéines, mises en évidence par exemple pour des protéines telles que Jun ou Fos. Il devient également nécessaire de mieux préciser le rôle du chaperonnage, en particulier, dans l'assemblage des complexes multiprotéiques. Ceci est actuellement abordé sur différents modèles : assemblage des ribosomes, complexes respiratoires mitochondriaux, etc.

Il existe encore un décalage important entre nos connaissances des événements intervenant aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, décalage qui tient à la fois à des raisons historiques, à la grande diversité des mécanismes mis en jeu, mais aussi, sans doute, à des aspects techniques. Il est en effet nécessaire de disposer de méthodes quantitatives sensibles pour évaluer le rôle relatif des nombreuses étapes possibles d'un contrôle

post-transcriptionnel. Le développement de méthodes de quantification en imagerie des protéines (quantification en double marquage, comparaison automatisée des électrophorèses 2D) doit être encouragé. Indépendamment de l'aspect cognitif, l'accroissement des connaissances dans ce domaine permettra de mieux appréhender certaines pathologies (expression et prolifération virale, progression tumorale, etc.) et d'aider à une meilleure maîtrise de certains aspects de la thérapie génique par l'optimisation des systèmes d'expression, problème qui est actuellement abordé principalement au niveau transcriptionnel.

## 4. 2 CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE DE L'EXPRESSION DES GÈNES

Si le phénotype d'une cellule ou d'un organisme est fondamentalement le résultat de l'intégration rapide de l'information génétique qu'ils contiennent et des signaux qu'ils reçoivent, l'existence d'une mémoire moléculaire héritable peut intervenir pour moduler l'expression génétique. Dans ce cas, ce n'est pas tant la séquence du gène qui va déterminer son patron d'expression que l'empreinte d'événements qui se sont produits antérieurement et qui se transmet au cours des générations cellulaires. Dans ce domaine, de nouveaux aspects du fonctionnement cellulaire ont été révélés au cours des dernières années (empreinte génotypique parentale, hérédité structurelle des protéines).

Ce contrôle épigénétique peut s'exercer à différents niveaux. Le premier niveau est chromosomique par l'intermédiaire d'au moins deux types de modifications, la méthylation de bases et la structure chromatinnienne. Des régulations de cette nature ont été mises en évidence dans le contrôle de l'expression de gènes dans un nombre croissant de situations biologiques. Elles ont en particulier été décrites chez les mammifères au cours du développement, lors de l'installation et de la progression de l'état tumoral ou dans le contrôle de l'expression monoallélique de certains gènes au cours de la différenciation cellulaire, et éventuellement au cours du vieillissement. Il peut également s'agir de phénomènes intervenant lors de la transgenèse ou à la suite d'accidents chromosomiques (effets de posi-

tion) ou de la duplication de gènes. La compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu revêt donc un intérêt essentiel, et le nombre de publications connaît dans ce domaine une progression très importante et très rapide. Ces phénomènes ne sont pas limités aux mammifères, ils sont également présents et analysés chez les invertébrés (drosophile, nématode : *Caenorhabditis*) et chez les végétaux, ainsi que chez les micro-organismes où différents modèles biologiques sont explorés (levures : variégation associée aux structures chromatiniennes télomériques ou centromériques ; champignons : méthylation ; trypanosomes : expression des VSG en position télomérique, etc.). Il faut également signaler les études conduites sur les phénomènes de co-suppression chez les végétaux suggérant l'existence d'un contrôle épigénétique post-transcriptionnel affectant le transport ou la stabilité des ARN messagers.

De nombreux problèmes restent à résoudre, recensement des gènes concernés, mécanismes de l'installation et de la levée de l'empreinte (signaux, protéines), modalités de l'héritabilité de ces empreintes au cours des divisions cellulaires, etc. Le potentiel de recherche en France est significatif dans plusieurs de ces différents aspects, que ce soit sur l'homme ou la souris, les végétaux ou les micro-organismes. Il serait cependant nécessaire de faire un état des lieux précis et de structurer des interactions entre les groupes impliqués dans ces travaux (colloque national, appel d'offres ?). Il faut également intégrer dans ces thématiques les travaux en cours dans différents laboratoires sur la structuration des domaines chromatiniens et sa dynamique (relations avec la régulation de l'expression génétique).

Il est prévisible que les informations dans ce domaine seront essentielles dans la compréhension de certains aspects fondamentaux de la biologie cellulaire tels que le développement, le contrôle de la prolifération ou le vieillissement.

Un contrôle épigénétique a été caractérisé récemment au niveau protéique grâce aux travaux sur la protéine prion. Ces travaux ont mis en évidence la possibilité pour une forme de cette protéine de transmettre son état conformationnel à des molécules identiques, mais présentant une autre

configuration. Des situations comparables du point de vue phénoménologique ont été décrites chez des micro-organismes, levure et champignon, pour plusieurs protéines ayant des fonctions différentes, ce qui suggère que cette héritéité structurale peut avoir une portée assez générale. Les laboratoires français impliqués dans ces études ont été bien recensés à l'occasion de l'appel d'offres ACC-SV 10 : "Pathologies associées aux prions". Compte tenu de l'incidence sociale et économique des maladies à prions et de l'implication possible de phénomènes comparables dans d'autres maladies neurodégénératives, les activités de recherche dans ce domaine doivent être développées. Les pistes de recherche à explorer portent sur la compréhension des relations entre la structure de ces protéines et les changements conformationnels (nécessité d'une forte collaboration avec les biochimistes structuralistes), la caractérisation d'autres gènes éventuellement impliqués dans ces changements conformationnels ("chaperones" ?), les moyens permettant de moduler *in vivo* les états conformationnels de ces protéines, etc. L'objectif doit être, à terme, le développement d'approches thérapeutiques permettant la maîtrise des pathologies associées à ce type d'événement.

La transmission d'une information structurale au niveau protéique doit également être mise en jeu dans le maintien et la transmission de l'organisation de structures supramoléculaires comme le cytosquelette. La notion que l'organisation cellulaire et le développement ne découlent pas seulement de la spécificité des molécules en jeu, mais dépendent aussi de polarités et de différenciations pré-existantes est actuellement largement suggérée par différents travaux sur la polarité cellulaire (embryon de drosophile, plans de division chez *C. elegans*, bourgeonnement chez la levure), le cytosquelette chez la paramécie ou l'organisation de centres organisateurs des structures microtubulaires. La compréhension de ces aspects de la biologie cellulaire constitue donc un enjeu important.

## 5 - MICROBIOLOGIE

### 5. 1 DE LA DÉFINITION DES MICRO-ORGANISMES

Pour la Société Française de Microbiologie (SFM), la définition inclut bactéries, protistes eucaryotes, bactériophages et virus ! Il semble cependant raisonnable de limiter la définition aux micro-organismes procaryotes et eucaryotes et à leurs virus. Le flou relatif dans une définition claire des micro-organismes entraîne souvent une difficulté de perception d'une véritable communauté des microbiologistes : de fait, à part la SFM, il n'y a pas réellement de cadre organisé où les microbiologistes peuvent se retrouver. Une possibilité serait de tirer parti de l'infrastructure de l'ATIPE Microbiologie, qui pourrait être enrichie par l'organisation de colloques d'une part, et de laboratoires de microbiologie "sans murs" d'autre part.

#### Des découvertes à faire sur le plan fondamental

Il faut maintenir un effort de recherche en microbiologie car il reste encore beaucoup à apprendre sur les mécanismes fondamentaux du vivant : cycle cellulaire, modèles de développement et de différenciation, contrôle de la densité de la population cellulaire, réponse et adaptation aux signaux environnementaux, topologie et assemblage des protéines membranaires, théories de l'évolution, etc.

Les micro-organismes, notamment les bactéries, constituent des modèles extraordinaires pour ces études, y compris pour éclairer les problèmes des "eucaryotes supérieurs". On constate en effet une remarquable conservation des séquences, mais surtout de la structure des protéines et de leurs fonctions : un tout petit nombre de motifs structuraux utilisés encore et encore dans tous les organismes, y compris l'homme. Cette constatation justifie certaines extrapolations aux eucaryotes supérieurs. C'est le cas de l'étude du cycle cellulaire

chez la levure et chez *Aspergillus* qui éclaire la connaissance du contrôle du cycle chez les mammifères. C'est le cas des transporteurs ATP-dépendants (famille ABC) et de certains gènes impliqués dans la résistance aux drogues, des gènes de réparation et leurs équivalents humains impliqués dans le cancer héréditaire du colon. C'est le cas du devenir de deux cellules filles et des mécanismes de différenciation, des rythmes circadiens, des analogies entre la translocation nucléaire chez *Aspergillus* et le développement neuronal, etc.

"Limiter cette source d'idées novatrices en arrêtant de soutenir la recherche et la formation en microbiologie serait rapidement désastreux".

#### Les mécanismes de pathogénicité

Les micro-organismes pathogènes constituent un problème important pour le citoyen, qu'il s'agisse de santé publique avec les pathogènes de l'homme, ou d'agronomie avec les pathogènes des plantes et des insectes. Nous connaissons encore peu de choses sur les mécanismes moléculaires de la pathogénicité, en particulier sur les interactions avec l'hôte. Ces axes de recherche sont peu développés en France et constituent un champ d'étude passionnant, tant sur le plan de la recherche fondamentale qui intéresse le CNRS, que des possibilités de recherche finalisée (INSERM, INRA).

### 5. 2 LES MICROBES EUKARYOTES (LEVURES, CHAMPIGNONS)

Il est difficile de faire un état des recherches sur la (les) levure(s), étant donné la multitude de travaux sur ces organismes. On peut toutefois remarquer l'existence d'une véritable communauté des levuristes, d'abord au niveau français, mais aussi au niveau européen, avec des réunions, des informations qui circulent, des programmes coordonnés. C'est un atout important au moment où la totalité de la séquence nucléotidique de la levure de boulanger (*S. cerevisiae*) est connue, et où l'exploitation de ces séquences va commencer. L'analyse fonctionnelle de ce génome et les relations entre celle-ci et les pathologies humaines et

végétales constitue une ouverture intéressante. Il faut signaler, d'autre part, l'intérêt de *S. cerevisiae* pour l'étude des organelles (mitochondries, peroxisomes etc.) et la façon dont la cellule contrôle leur biogénèse. Enfin, ne pas oublier les avantages des modèles de la levure de fission (*Schizosaccharomyces pombe*) et *Aspergillus nidulans*, et leur important développement actuel.

Les champignons filamentueux constituent un relais particulièrement intéressant entre levures et eucaryotes pluricellulaires. On peut citer plusieurs exemples où des contributions majeures à la compréhension de phénomènes biologiques ont été apportées.

- *Ascobolus immersus*, dont l'utilisation a permis l'étude des mécanismes de recombinaison méiotique, est maintenant un modèle pour l'étude du processus du MIP, dans lequel la méthylation des gènes dupliqués conduit à leur extinction,

- *Fusarium oxysporum*, qui est par ailleurs un pathogène de plantes, constitue un modèle extraordinaire pour l'étude des éléments transposables. Sept familles de transposons, représentatives des classes majeures d'éléments génétiques mobiles chez les eucaryotes ont été répertoriées, avec leurs conséquences sur le fonctionnement du génome et sa plasticité (inactivation de gènes, réarrangements chromosomiques...),

- *Podospora anserina* est un modèle de choix pour l'étude des processus dégénératifs (sénescence, mort prématuée) associés à des remaniements du génome mitochondrial. Il est aussi un modèle prometteur pour les mécanismes de différenciation des cellules après la fécondation et des phénomènes de lyse des cellules hétérocaryotiques par fusion entre filaments de deux souches différentes (incompatibilité végétative).

## 5. 3 FAUT-IL SOUTENIR LES RECHERCHES SUR LES MODÈLES BACTÉRIENS CLASSIQUES OU SUR UNE VARIÉTÉ DE MODÈLES ?

On peut donner de nombreux exemples montrant que la recherche sur les bactéries classiques est encore d'une actualité brûlante : découverte des introns de groupe II chez *E. coli*, autoépissage et sans doute "intron homing" ; possibilité de poly-adenylation chez *E. coli* ; mise en évidence des hélicases de la famille "DEAD box" toujours chez *E. coli*.

D'autre part, les modèles classiques constituent des outils inégalés pour mieux comprendre les relations structure-fonction des protéines si l'on veut aborder ensuite l'étude de systèmes complexes chez les mammifères. Un autre avantage décisif de ces modèles est la masse considérable d'informations apportées depuis des années sur leur morphologie, leur physiologie et leur métabolisme, et les innombrables mutants dont on dispose. Ces données permettront de relier de façon très pertinente les informations de séquences à la physiologie de ces organismes. Il est impensable d'abandonner ces modèles à un moment aussi décisif. Les modèles comme *E. coli* et *B. subtilis* permettront non seulement d'éclairer de nombreux problèmes chez les eucaryotes, mais encore de découvrir de nouvelles fonctions et d'analyser complètement des édifices macromoléculaires.

Un autre point de vue (non exclusif) est de considérer qu'il faut au contraire étudier une grande variété de modèles en utilisant chacun d'eux pour sa capacité à éclairer au mieux un problème donné. Par exemple *B. subtilis* pour la sporulation, *C. crescentus* pour le cycle cellulaire, *Synechococcus* sp. (cyanobactéries) comme progéniteurs des chloroplastes, *Sulfolobus* (archéobactéries) ou *Thermotoga* (eubactéries) pour les études sur la thermophilie, etc.

De ce point de vue, l'apport du séquençage sera décisif, car il va permettre des comparaisons intéressantes, non seulement en termes de phylogénie moléculaire, mais aussi d'évolution des structures et des fonctions cellulaires des organismes en

relation avec leur mode de vie. Enfin, il faut utiliser la variété des micro-organismes comme outils d'analyse de gènes essentiels que l'on a ou que l'on va retrouver chez les mammifères.

## 5. 4 L'APPORT DES MICRO-ORGANISMES MARINS, PARTICULIÈREMENT LES THERMOPHILES

Récemment, l'étude des sources chaudes sous-marines a permis de décrire une multitude de micro-organismes nouveaux. Ces découvertes stimulent les recherches fondamentales sur les extrémophiles, notamment sur les mécanismes moléculaires de l'adaptation aux hautes températures et pressions (découverte d'enzymes aux propriétés nouvelles), et sur l'évolution des organismes et les origines de la vie. On formule maintenant l'hypothèse d'une biosphère souterraine dominée par les micro-organismes. Le séquençage de plusieurs génomes d'organismes thermophiles et hyperthermophiles est en cours.

Parallèlement, l'instrumentation s'est développée pour répondre aux besoins de ces études : un submersible, le Nautile, des incubateurs sous haute pression, des fermenteurs adaptés pour la production de biomasse, etc. Ces études ont stimulé l'interdisciplinarité avec les géochimistes, les minéralogistes, les physiciens.

Les recherches sur les micro-organismes marins sont développées principalement dans trois pays : États-Unis, Japon, France. En France, le GDR Bactocéan regroupe à la fois des laboratoires à vocation finaliste (IFREMER) et des laboratoires de recherche fondamentale (CNRS, Universités).

## 5. 5 L'IMPORTANCE DE L'ÉCOLOGIE MICROBIENNE

“Les micro-organismes ne vivent pas dans les boîtes de Pétri !”

### Pourquoi est-il important de développer ce secteur ?

- Le sol contient une très grande richesse d'espèces microbiennes (et encore ce n'est rien à côté de la flore tellurique) qui reste inexploitée.

- Le sol et la rhizosphère contiennent des bactéries impliquées dans les cycles biochimiques majeurs de notre planète : il faut identifier plus précisément les fonctions métaboliques clés et les organismes qui sont responsables.

- Les conditions très changeantes du sol et de la rhizosphère imposent une adaptation et une interaction entre micro-organismes.

Il y a des applications non exploitées des bactéries du sol, notamment comme agents antimicrobiens.

### Que faut-il étudier ?

- Les grandes réactions de transformations des métabolites.

- Les mécanismes d'adaptation à l'environnement, notamment chez les extrémophiles.

- Les phénomènes de co-évolution - symbiose - parasitisme.

- Les études de taxonomie et d'évolution (Woese), la caractérisation d'espèces non cultivables, l'étude de leur représentativité, et de leur distribution. L'un des outils pour ces études : la biologie moléculaire.

## 5. 6 LA PLURIDISCIPLINARITÉ ET LES RETOMBÉES SUR LES RECHERCHES FINALISÉES

L'étude des micro-organismes stimule considérablement les recherches interdisciplinaires. Tous soulignent le très grand pouvoir de rassemblement de la microbiologie, qui réunit des spécialistes de disciplines très variées :

## Recherches fondamentales

Interface avec les biophysiciens pour les études des relations structure-fonction des protéines et des interactions protéines-acides nucléiques, par RMN, rayons X, microscopie électronique, photonoïque, cristallographie 2D, modélisation etc., apport des immunologues pour disséquer l'organisation moléculaire des protéines et pour l'optimisation d'abzymes.

Interfaces avec les archéologues et les géologues pour l'identification de micro-organismes présents dans les ossements ou les sédiments.

## Recherches finalisées

Interfaces entre les chimistes, les géochimistes, et les microbiologistes pour les problèmes de bioconversion, notamment dans le cas des bactéries ou archaebactéries métabolisant le soufre. Interface avec les Sciences de l'ingénieur – notamment dans le cas des extrémophiles – pour l'extraction de minéraux, et aussi pour l'étude des organismes vivant sous haute pression.

Interface avec les écologistes pour les problèmes de dépollution. Interface avec l'industrie agro-alimentaire pour le contrôle bactériologique de qualité des produits. Interfaces avec les domaines médicaux et agronomiques pour l'étude des pathogènes des mammifères, des insectes et des plantes.

## 5. 7 QUELS DANGERS MENACENT LA MICROBIOLOGIE ? COMMENT SOUTENIR CETTE DISCIPLINE ?

Les difficultés que cette discipline traverse résultent, de l'avis général, d'une accumulation de circonstances défavorables : une politique favorisant plutôt les organismes pluricellulaires, la médiatisation et l'effet de mode pour le SIDA, la génétique humaine, la thérapie génique, etc. La conséquence de cette politique a été la difficulté accrue d'attirer de bons étudiants dans ce domaine où postes et finan-

cements étaient quelque peu réduits. Une autre difficulté réside dans le manque de définition précise de la communauté des microbiologistes (voir plus haut).

Les remèdes dans la situation actuelle sont les suivants :

- mieux définir les contours de notre communauté ;

- resserrer les liens à l'intérieur de cette communauté, par exemple grâce à des colloques et par la mise en route d'échanges de compétences et de chercheurs à travers la constitution de laboratoires sans murs, associant, si nécessaire, divers EPST : CNRS, INSERM, INRA, IFREMER ;

- intégrer harmonieusement les recherches les plus fondamentales et les recherches les plus finalisées ;

- ne pas oublier notre devoir de citoyens du monde et penser à développer les recherches sur les pathogènes, pour des raisons humanitaires, mais aussi scientifiques et économiques ;

- maintenir les recherches sur les organismes pour lesquels une très grande accumulation de connaissances existe déjà (E. coli, B. subtilis, S. cerevisiae), mais soutenir l'idée d'une variété de modèles bactériens, archaebactériens, eucaryotes dits "inférieurs" pour leur capacité à résoudre au mieux un problème biologique (cycle cellulaire, différenciation, adaptation à l'environnement, etc.) et leur propriété éventuelle d'avoir mis en place tel ou tel mécanisme développé par la suite chez les métazoaires ;

- renforcer les liens avec nos partenaires européens, tout en sachant que les projets finalisés sont largement favorisés par la CEE.

La recherche de soutien financier et de postes, notamment de post-doctorants, est évidemment une difficulté majeure de la discipline.

En principe, la communauté européenne a pour tâche de soutenir des projets de recherche assez finalisés, cependant que les États soutiennent davantage les recherches les plus fondamentales. Malheureusement, l'apport des EPST est notoirement très insuffisant.