



Le système double-hybride, mode d'emploi

Anne Plessis, Jacques H. Camonis

Société Française de Génétique

Président

A. Nicolas

Président d'honneur

F. Jacob

Vice-présidents

R. Berger

H. Pinon

C. Stoll

Secrétaire général

M. Solignac

Trésorier

P.-M. Sinet

Prière d'adresser toute correspondance au Secrétariat général de la SFG, Michel Solignac, laboratoire de biologie et génétique évolutives, bâtiment 13, Cnrs, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

Comité de rédaction

A. Bernheim

M. Bolotin-Fukuhara

M. Fellous

J. Générumont

B. Michel

R. Motta

A. Nicolas

S. Sommer

P. Thuriaux

D. de Vienne

Secrétaire

M.-L. Prunier

Les méthodes classiques de l'analyse des interactions protéine-protéine : de la génétique à la biochimie

Après une période consacrée à l'étude de l'ADN puis à celle du couple ADN et protéines, on assiste à un retour de la biochimie et de la biologie cellulaire caractérisé par un intérêt de plus en plus grand porté aux interactions protéine-protéine. Jusqu'à récemment, l'identification de partenaires protéiques reposait essentiellement sur des approches génétiques, biochimiques ou de criblage *in vitro* de banques d'expression.

L'approche génétique consiste à identifier des gènes dont le produit est susceptible d'interagir avec celui d'un premier gène, en recherchant des suppresseurs extragéniques spécifiques d'allèle ou des combinaisons génétiques létales. Cependant, bien que la mise en évidence de telles interactions génétiques soit indicatrice d'une interaction au niveau des produits des gènes impliqués, elle n'en constitue pas une démonstration moléculaire directe.

Par ailleurs, des méthodes biochimiques très variées peuvent également être utilisées pour identifier les partenaires d'une protéine donnée : copurification, rétention sur une colonne sur laquelle l'un des deux partenaires est préalablement fixé, co-immunoprécipitation, pontage covalent, etc. Dans certains cas, lorsque l'on peut détecter l'action d'une protéine sur un partenaire (modulation de l'activité de cette dernière ou modification postranscriptionnelle), il est également possible d'utiliser ce critère pour la purifier. Ces approches biochimiques ont permis la mise en évidence de nombreuses interactions, comme

celles entre l'activateur transcriptionnel MyoD et des protéines qui modulent son activité au cours de la myogenèse [1], ou encore entre la protéine GAP (*GTPase activating protein*) et p190 [2]. Cependant, ces méthodes présentent les limites qui sont inhérentes à leur mise en œuvre *in vitro* : conditions expérimentales parfois peu physiologiques et sensibilité restreinte par des lavages destinés à réduire les interactions non spécifiques. En outre, après avoir repéré un nouveau partenaire, il reste souvent un très long parcours avant son identification, sa caractérisation et l'isolement de l'ADN codant pour la protéine.

Cette dernière limitation est évitée dans le « clonage par interaction » qui consiste à cribler une banque d'expression d'ADNc avec une protéine purifiée et détectable. Un signal positif indique la présence d'une protéine interagissant avec la sonde. Ce type d'approche a conduit, par exemple, à l'isolement d'un partenaire du proto-oncogène Myc : Max [3]. Cependant, les inconvénients de cette méthode demeurent ceux spécifiques aux méthodes biochimiques *in vitro*.

Le système dit double-hybride, développé depuis 1989, est une méthode de clonage par interaction *in vivo*, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elle a déjà conduit à la caractérisation d'interactions entre des protéines de levure mais également de drosophile et de mammifères (*pour revue*, voir [4, 5]). Le but de cette revue est de décrire cette nouvelle approche, ses apports et ses limitations. Son principe, ainsi que ses variantes, seront tout d'abord présentés. Ensuite, quelques exemples représentatifs seront détaillés afin d'illustrer à la fois les principales

étapes et le type d'information que ce système est susceptible d'apporter. Enfin, après un résumé de l'ensemble des résultats obtenus, ses perspectives et ses limites seront discutées.

Le principe du système double-hybride : reconstitution d'un activateur transcriptionnel fonctionnel par interaction protéique (figure 1)

Le système double-hybride, initialement développé par Song et Fields en 1989 [6], tout comme celui appelé « piège à interaction » du laboratoire de R. Brent [7, 8], repose sur le fait que l'activité de nombreux facteurs activateurs de transcription eucaryotes ne nécessite que deux domaines (figure 1A) : un domaine activateur qui n'a pas la capacité de lier l'ADN et un domaine de liaison à l'ADN. Ce dernier se fixe à une séquence d'ADN spécifique et son rôle est uniquement d'ancrer la partie activatrice à sa cible. Lorsque les deux domaines sont séparés (figure 1B et 1C), ils ne sont plus capables d'induire l'activation de la transcription car le domaine d'activation n'est plus positionné par rapport à sa cible. Dans le système double-hybride, le domaine de liaison de l'ADN est fusionné à une protéine A et le domaine d'activation est fusionné à une protéine B. Si, et seulement si, A et B interagissent, un complexe est formé qui reconstitue un facteur de transcription fonctionnel (figure 1D). L'interaction entre ces deux protéines est révélée par l'expression d'un gène rapporteur placé sous contrôle de la séquence reconnue par le domaine de liaison à l'ADN de l'activateur bipartite. Cette méthode, ou ses dérivés, peut être utilisée pour établir ou caractériser l'interaction entre deux protéines (ou domaines protéiques) que l'on soupçonne d'interagir, mais aussi pour rechercher, au sein d'une banque de fusion, de nouveaux partenaires protéiques d'une protéine donnée qui sert d'appât (*m/s* n° 2, vol. 10, p. 206).

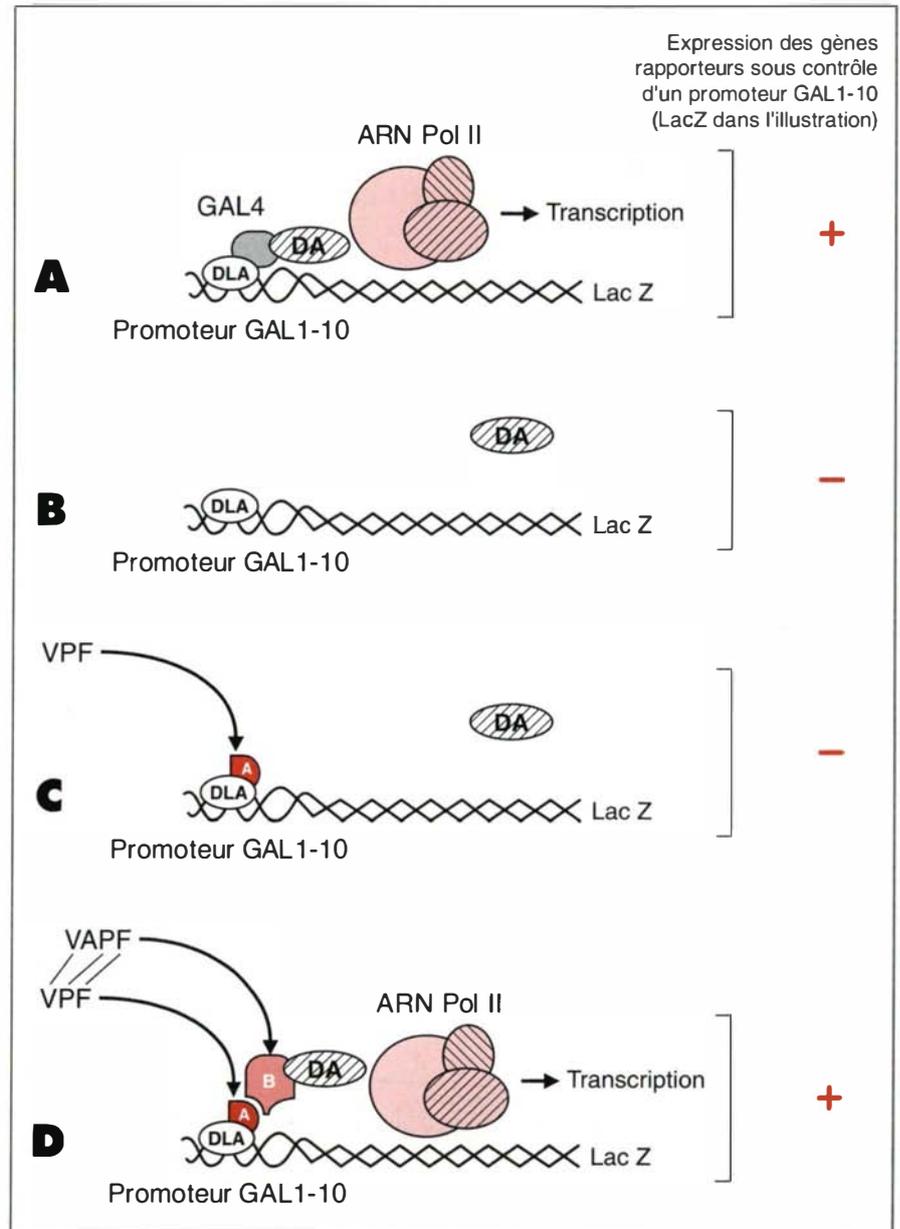


Figure 1. Le système double-hybride : principe de fonctionnement. Le système original mis au point par Fields et Song [6] est présenté ici. Le principe de tous les systèmes doubles-hybrides utilisés est le même. **A.** La protéine GAL4 est constituée d'un domaine de liaison à l'ADN (DLA) qui se lie à des régions spécifiques du promoteur des gènes GAL1-10, d'un domaine d'activation (DA) qui recrute la machinerie de transcription et d'une région reliant les deux domaines. Si le promoteur des gènes GAL1-10 est fusionné à la région codante du gène lacZ, l'expression de lacZ est sous le contrôle de la protéine GAL4. **B.** Si la région reliant le domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'activation est déletée, le domaine d'activation n'est plus positionné correctement et il n'y a plus d'expression de lacZ. **C.** Cette situation n'est généralement pas modifiée par la fusion au domaine de liaison à l'ADN de VPF (Votre Protéine Favorite = A). **D.** Ici VPF est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN, et votre Autre Protéine Favorite (VAPF = B) est fusionnée au domaine d'activation. Si VPF et VAPF sont capables d'interagir, un complexe de transcription fonctionnel est reconstitué et le gène lacZ est exprimé.

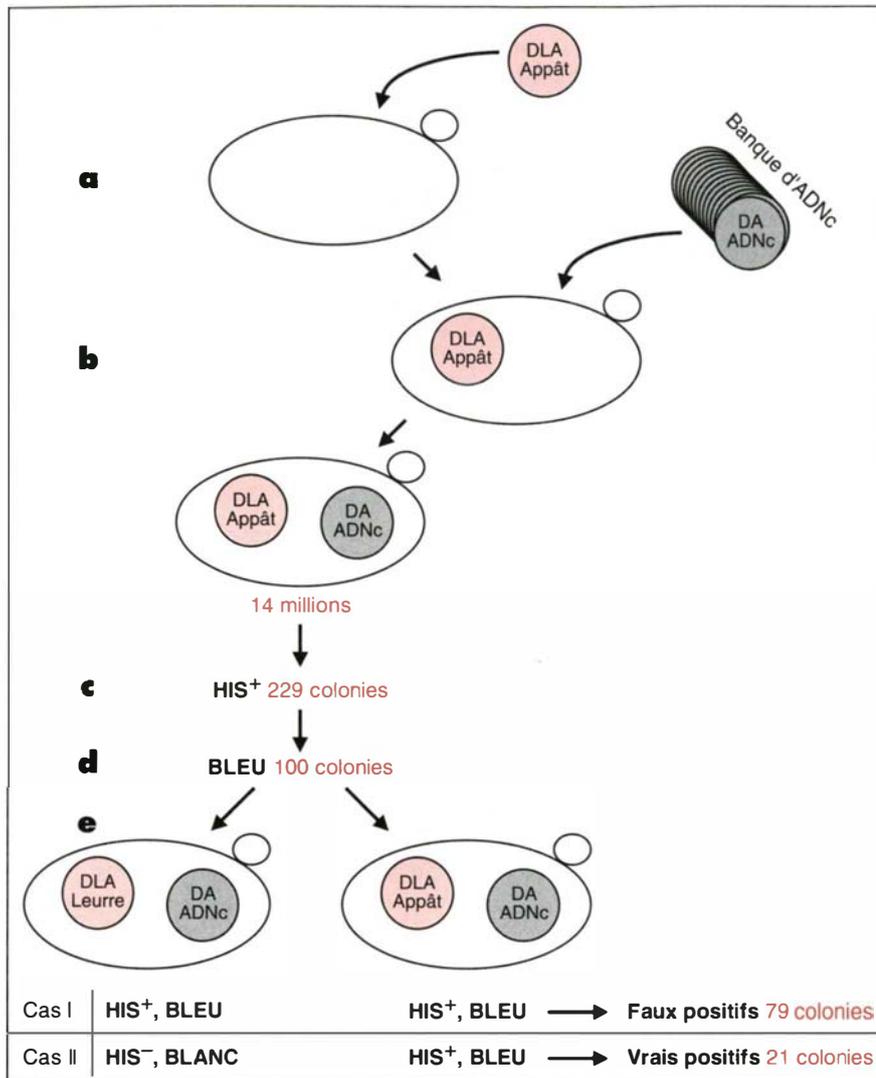


Figure 2. Application du système double-hybride au criblage d'une banque d'ADNc. Les protéines hybrides (l'appât fusionné au domaine de liaison à l'ADN (DLA) et les produits des ADNc fusionnés au domaine d'activation (DA)) sont exprimés à partir de plasmides réplicatifs qui portent des marqueurs de sélection non représentés sur le schéma. Dans l'exemple illustré, les gènes rapporteurs utilisés sont HIS3 et lacZ. Les nombres en rouge correspondent à l'exemple du criblage réalisé par Vojtek et al. en criblant une banque d'ADNc avec la protéine p21Ras [10]; (a) introduction de l'appât fusionné au domaine de liaison à l'ADN (DLA) dans la souche de levure réceptrice; (b) transformation avec une banque d'ADNc; (c) sélection des colonies HIS⁺; (d) détection, parmi les colonies His⁺, des colonies LacZ⁺ qui sont colorées en bleu en présence d'X-gal; (e) test de spécificité: les plasmides conférant les phénotypes His⁺ et LacZ⁺ sont-ils spécifiques de l'appât? Ces plasmides sont testés en présence, soit d'un plasmide exprimant l'appât, soit d'un plasmide portant un ADN sans rapport avec l'appât (le leurre). Cela peut se faire, soit par un test de ségrégation-conjugaison [10, 18], soit par transformation.

Cas I: les phénotypes His⁺ et LacZ⁺ sont retrouvés avec le leurre aussi bien qu'avec l'appât. Les poubelles de la science accueilleront ces colonies et ces plasmides-là. **Cas II:** les propriétés His⁺ et «LacZ⁺» ne sont retrouvées qu'avec l'appât. L'ADNc isolé est bien spécifique de l'appât. Mais vous n'êtes pas au bout de vos peines: cette interaction est-elle biologiquement significative? Là est maintenant la question.

Les hybrides

Dans le système original de Song et Fields, les fusions sont réalisées avec les deux domaines de l'activateur de levure GAL4. On peut également créer de nouveaux activateurs bipartites à partir de fusions faites avec des domaines activateurs et de liaison à l'ADN ne provenant pas de la même source [8-11]. Théoriquement, n'importe quelle combinaison entre les deux types de domaine devrait convenir.

Le test d'activation transcriptionnelle requiert, bien sûr, une localisation nucléaire des deux partenaires. Afin de favoriser celle-ci, un des deux, voire les deux hybrides, sont fusionnés à une séquence nucléaire [7]. En outre, pour l'étude des protéines membranaires, seuls les domaines cytoplasmiques ou extracellulaires sont employés pour la construction des hybrides [12].

Pour la recherche de gènes dont le produit interagit avec un « appât » donné, ce dernier est fusionné au domaine de liaison à l'ADN, alors que les banques d'ADN complémentaires sont construites sous forme d'hybrides avec le domaine activateur. En effet, de nombreuses séquences sont susceptibles d'activer la transcription et leur fusion à un domaine de liaison à l'ADN conduirait à un bruit de fond très élevé [13]. A l'inverse, il existe peu de séquences capables de se fixer à une séquence d'ADN donnée. A priori, un clone sur trois ou six conduit à une fusion productive, selon que l'ADNc est orienté ou non.

Les principales étapes d'un criblage d'une banque d'ADNc par la méthode double-hybride sont représentées dans la figure 2.

Les rapporteurs

Le test permettant de déceler l'interaction entre les deux fusions est un test de transcription d'un gène rapporteur. Ce gène est placé en aval d'une séquence spécifique du domaine de liaison à l'ADN utilisé pour la construction de l'un des hybrides. Son expression dépend donc de la reconstitution d'un activateur bipartite fonctionnel par inte-

reaction entre les deux hybrides. Deux types de rapporteurs sont utilisés: le gène *lacZ* codant pour la β -galactosidase dont l'expression conduit à l'apparition d'une couleur bleue en présence du substrat chromogène X-gal et des gènes tels que *HIS3* ou *LEU2*, pour lesquels les souches réceptrices sont mutées, qui permettent une sélection directe sur un milieu sélectif approprié. Lors des expériences de criblage de banques, l'identification des clones positifs a lieu en deux étapes: après sélection pour un marqueur d'auxotrophie, seuls les clones bleus sont ensuite gardés.

Récemment, des systèmes doubles-hybrides qui utilisent comme hôte des cellules de mammifères en culture au lieu de la levure ont également été mis au point [14-17]; à notre connaissance, un seul exemple de criblage d'une banque dans des cellules en culture a été publié [17].

L'élimination des faux-positifs (figure 2)

Lorsque le test d'interaction se révèle positif, il est ensuite nécessaire de vérifier que l'activation observée est bien spécifique de l'interaction entre la nouvelle protéine candidate et l'appât utilisé. En effet, on obtient toujours des clones dits «faux-positifs», qui codent pour des polypeptides qui activent seuls l'expression des gènes rapporteurs, ou qui peuvent interagir directement avec le domaine de liaison à l'ADN de l'autre hybride (*pour revue*, voir [18]). Afin d'éliminer ces clones, les plasmides initialement sélectionnés sont testés à nouveau en présence de l'appât d'origine et aussi en présence d'une fusion contrôlée réalisée entre le domaine de liaison à l'ADN et une protéine sans relation avec cet appât [10, 18, 19]. Les clones qui sont positifs avec les deux partenaires sont des faux-positifs qui peuvent représenter, selon les cas, de 10 % à 99 % des clones initialement isolés.

L'apport des systèmes doubles-hybrides

Depuis la première communication

de Song et Fields [6], près de soixante articles utilisant un système double-hybride ont été publiés. Ainsi, les interactions entre plus de soixante couples de protéines ont été testées dans la levure et une vingtaine d'appâts ont été utilisés pour le criblage de banques. La grande majorité de ces travaux porte sur des protéines jouant un rôle dans la signalisation intracellulaire ou dans le contrôle de la transcription; quelques exemples de résultats obtenus dans ces deux domaines sont détaillés ici.

Les voies de signalisation cellulaire

La technique double-hybride s'est montrée décisive pour l'étude des voies de transduction dans lesquelles interviennent les produits des proto-oncogènes *ras*. Ras est nécessaire à la transduction du signal de récepteurs à activité tyrosine kinase cytoplasmique (RTK). Malgré la foison d'informations concernant son produit p21Ras, les molécules interagissant avec Ras pour participer à sa fonction sont restées longtemps inconnues. En particulier, aucune protéine ne co-immunoprécipitait avec p21Ras, ni n'était retenue sur des colonnes d'affinité avec p21Ras. D'une part, des données génétiques plaçaient le produit du proto-oncogène *raf* en aval de la cascade où agissait p21Ras, mais rien ne suggérait un lien direct Ras-Raf. D'autre part, la biochimie et la génétique avaient permis l'identification de deux types de molécules agissant dans la cascade de transduction entre RTK et Ras: les facteurs d'échange de Ras et l'adaptateur moléculaire Grb2/Sem5 (*m/s n° 4, vol. 8, p. 388; n° 5, vol. 8, p. 471; n° 3, vol. 9, p. 334*) [20]. Il restait à préciser les relations entre ces composants.

A. Vojtek *et al.* [10] ont utilisé la technique du double-hybride pour identifier les molécules capables d'interagir avec une forme activée de Ras, p21^{Val12}: parmi d'autres, un ADNc partiel codant pour Raf était isolé (*figure 2* et *Tableau 1*). Le contact direct était ensuite confirmé par colonne d'affinité. Ce résultat s'est avéré en accord avec ceux obtenus

indépendamment (par la biochimie tout comme par le système double-hybride) par d'autres équipes [21-23].

Parallèlement, soit par la biochimie, soit par la technique du double-hybride, plusieurs équipes ont montré que les protéines d'échange de Ras codées par les gènes *sos* se lient à Grb2 et que cette liaison implique les domaines SH3 de Grb2 et la région riche en prolines des protéines Sos ([24], et par exemple [25]). Ainsi, en peu de temps, une voie de transduction était, sinon totalement décryptée, du moins mise en évidence, allant des RTK à Raf en passant par Grb2, hSos et Ras. La technique de double-hybride a été pour partie décisive, pour partie complémentaire d'autres approches.

D'autres interactions, comme celle par exemple entre les protéines kinases Raf et MEK [21, 26], entre Raf et l'inhibiteur I κ B du facteur de transcription NF κ B [27] ou encore entre la sous-unité catalytique et la sous-unité régulatrice d'une phosphatidylinositol 3-kinase [28], ont également été mises en évidence par le système double-hybride.

Les facteurs de transcription

Le système double-hybride a également conduit à la mise en évidence d'un certain nombre d'interactions entre les divers éléments du contrôle transcriptionnel chez les eucaryotes. D'une part, il a permis de démontrer des interactions entre des éléments du complexe transcriptionnel de base, aussi bien entre des sous-unités des ARN polymérases [29], qu'au sein des protéines du complexe de transcription général TF qui se lie à la boîte TATA [17]. D'autre part, on a ainsi caractérisé des associations entre facteurs de transcription qui se fixent sur les régions régulatrices: par exemple, entre les membres de la famille du proto-oncogène Myc [30], entre Jun et ses partenaires (*voir ci-dessous*) ou encore entre les régulateurs de transcription myogéniques [31]. Enfin, le système double-hybride a également conduit à l'analyse d'interactions entre des facteurs de transcription généraux et des fac-

teurs régulateurs de la transcription [32-34].

En ce qui concerne les membres des activateurs transcriptionnels à motif bZIP de la famille de Jun, leur étude dans le système double-hybride est en accord avec les données biochimiques obtenues par immunoprécipitation, tests *in vitro* de fixation à l'ADN et tests de transcription. Ainsi, l'interaction entre Jun et Fos est confirmée, alors que l'homodimérisation de Jun s'est révélée très faible et celle de Fos indétectable [14, 35]. Le criblage de 105 colonies provenant d'une banque d'ADNc d'embryons de souris par le domaine bZIP de Jun fusionné au domaine activateur de GAL4 a conduit à l'obtention de 12 clones positifs (*Tableau I*) [35]. Parmi ces positifs, on trouve, outre deux clones codant pour des protéines totalement inconnues, le gène *fos*, des gènes codant pour des protéines à motif bZIP qui sont apparentées aux facteurs de transcription ATF/CREB et, enfin, de façon plus surprenante, les gènes des tropomyosines α et β . Cette dernière interaction pourrait être biologiquement significative (par exemple, les tropomyosines pourraient jouer un rôle dans la compartimentation de Jun en le séquestrant au niveau du cytosquelette) ou au contraire être artéfactuelle. Cela illustre la difficulté à interpréter certains résultats et la nécessité de confirmer les interactions observées sur le plan biologique.

En résumé : les interactions mises en évidence par le système double-hybride concernent des protéines de nature très variée.

Outre les exemples que nous avons développés ci-dessus, les systèmes doubles-hybrides ont permis l'analyse de nombreuses autres interactions qui concernent des protéines très diverses tant par leur nature que par leur fonction. Les résultats obtenus dans le cadre de la recherche de nouveaux partenaires par criblage de banques sont résumés dans le *Tableau I*.

Ainsi, cette méthode a permis la caractérisation d'interactions concer-

nant des protéines nucléaires, telles que celles impliquées dans la fonction des centromères [36], dans la structure de télomères [37], dans la maturation des ARN messagers [38-41], et également des protéines virales [42-44], des protéines mitochondriales [45], des récepteurs (membranaires ou nucléaires) [46, 12], des facteurs des voies de dégradation des protéines [47] ou encore des composants du cytosquelette [15, 48]. Elle a été également déterminante pour l'identification de partenaires des protéines régulatrices du cycle cellulaire. Des régulateurs de protéine kinases, telles que des cyclines [49, 50], des protéines phosphatases [8, 51, 52] ou encore des membres d'une nouvelle famille d'inhibiteurs (*m/s n° 2, vol. 10, p. 206*) [51, 53] ainsi que certains de leurs substrats ont ainsi été identifiés [54].

En résumé, l'analyse des clones obtenus par utilisation d'appâts a conduit au clonage de nombreux gènes (*voir Tableau I*) qui se répartissent en trois catégories : ceux déjà connus dont on ignorait toutefois que leur produit interagissait avec la protéine appât, ceux qui présentent une certaine similitude avec des familles de gènes connus, et, enfin, de nouveaux gènes pour lesquels on ne possédait aucune information préalable. Pour ces dernières catégories, le rôle éventuel de ces nouvelles protéines dans des processus biologiques communs aux appâts reste, bien sûr, à être établi (*voir ci-dessous*).

Conclusions : avantages, limites et perspectives

Par comparaison avec les systèmes *in vitro*, les systèmes doubles-hybrides offrent des conditions plus proches des conditions physiologiques naturelles pour les protéines d'eucaryotes supérieurs. En outre, un certain nombre des modifications post-traductionnelles rencontrées chez les eucaryotes supérieurs, (en particulier de très nombreuses glycosylations), sont réalisées chez la levure. Néanmoins, certaines d'entre elles peuvent ne pas avoir lieu ; ce pourrait

être le cas des phosphorylations de certaines tyrosines impliquées dans des interactions protéiques avec des domaines de type SH2 [62].

Par ailleurs, les tests doubles-hybrides étant réalisés *in vivo*, ils sont plus sensibles que la plupart des tests *in vitro*. Des interactions faibles, non décelables par co-immunoprécipitation, sont détectées par le système double-hybride [65]. Des interactions transitoires de type enzyme-substrat ont été mises en évidence entre une protéine kinase (SNF1) et une cible hypothétique, SIPI, dont la fonction n'est pas connue [59], ou encore entre la protéine phosphatase PPI α 2 et la protéine Rb du rétinoblastome [19].

Cependant, plusieurs paramètres, peuvent, *a priori*, empêcher la détection de certaines interactions dans le système double-hybride, en particulier des problèmes de toxicité, de taux d'expression, de stabilité des fusions, de transport nucléaire inefficace, d'encombrement stérique, etc. On ne connaît pas actuellement de limitation liée à la taille des protéines, mais aucune étude systématique n'a été faite sur ce point.

Un troisième partenaire (protéique ou non) peut également être nécessaire à l'interaction entre les deux hybrides étudiés. Par exemple, le criblage de banques avec la partie cytoplasmique du récepteur de l'hormone thyroïdienne a conduit à la mise en évidence d'interactions dépendantes de la présence d'hormone thyroïdienne dans le milieu de culture des levures [46]. De même, la dimérisation du facteur de transcription HAPI dépend de la présence d'un hème d'origine endogène ou exogène [63]. Grâce à un système à trois partenaires, des interactions multiples ont été démontrées. Par exemple, les protéines d'épissage de levure PRP9 et PRP11 n'interagissent pas directement mais par l'intermédiaire d'une tierce protéine SSP91, initialement identifiée par la génétique [39]. La plupart de ces difficultés potentielles sont spécifiques de chaque cas particulier et sont difficiles à évaluer *a priori*. Le développement de méthodes dou-

Tableau I
PRINCIPAUX RÉSULTATS OBTENUS PAR CLONAGE SUIVANT UNE MÉTHODE DOUBLE-HYBRIDE

APPAT				BANQUE d'ADNC				
nom	fonction	origine	clones positifs/criblés	clones positifs identifiés	confirmation de l'interaction	rôle connu ou supposé	remarque	référence
RAP	régulateur de transcription + silencing + structure télomères	levure	1/1,2 10 ⁵	RIF 1	génétique	<i>silencing</i> structure des télomères		[37]
SIR4	<i>silencing</i> (HMR et HML)	levure	2/2 10 ⁵	- SIR4 - SFII			premier exemple de clonage par la méthode double hybride	[55]
TFIIF (sous-unité Rap30)	facteur général de transcription	humain (HeLa et JY)		- Rap 74 - homologue cdc2	- biochimie - ?	- sous-unité de TFIIF -	test dans cellules de mammifères (CV1)	[17]
Yin-Yang-1	régulateur de transcription	humaine (HL60)	50/3 10 ⁵	cMyc	biochimie	protooncogène	pas d'interaction avec Max	[56]
Max	partenaire du proto-oncogène Myc	humain (HeLa)	80/7,5 10 ⁵	- cMyc - Mxi1	- biochimie - biochimie	- oncogène - régulation de cMyc	- domaine bHLH-Zip - id.	[57]
Jun (domaine bZIP)	facteur de transcription	souris (embryon)	11/10 ⁵	- cFos - 2 homologues ATF/CREB - α et β tropomyosines - 2 inconnues	- biochimie - ? - ? - ?	- facteur de transcription - id. - cytosquelette - ?	spécificité: pas d'interaction avec Fos	[35]
p53	suppresseur de tumeur	humain	36/7,5 10 ⁵	tous = p53				[58]
TR (domaine cytoplasmique)	récepteur hormone thyroïdienne (T3)	mammifère	14	- 5 homologues protéines nucléaires - 9: inconnues			- interactions nécessitant la présence d'hormone T3 dans le milieu	[46]
SNF1	protéine kinase (répression catabolique)	levure	16/3 10 ⁵	- SIP1 - SIP2, SIP3, SIP4	- biochimie	- répression catabolique	- phosphorylé par SNF1 <i>in vitro</i>	[59]
H-Ras	protéine G, transduction de signal	souris (embryon)	21/1,4 10 ⁷	- Raf (9) - autres inconnues	- biochimie et génétique	- protéine kinase = MAPK, transduction de signal		[10]
Bcl-2	proto-oncogène, régulation apoptose	humain	20/10 ⁶	- R-Ras (3) - autres: inconnus	- biochimie	protéine G	spécificité: pas d'interaction de R-Ras avec Rac ou Rho	[60]

bles-hybrides dans des cellules d'eucaryotes supérieurs en culture devrait permettre de remédier en partie à ces limitations. Quoi qu'il en soit, après la mise en évidence d'une nouvelle interaction, il est nécessaire de la confirmer par une méthode indépendante. Comme mentionné plus haut, la confirmation de sa «réalité physique» est généralement apportée par la bio-

chimie, par exemple par immunoprécipitation ou par rétention d'une protéine sur une colonne contenant son partenaire putatif.

Cependant, il est également nécessaire d'établir la «réalité biologique» d'une interaction. En effet, elle pourrait n'exister que chez la levure, dans les conditions de l'expérience, mais ne pas correspondre à une réalité dans l'organisme d'ori-

gine. Il est donc important de montrer que les deux partenaires identifiés participent à un processus biologique commun. Lorsque cela est possible, une analyse génétique, par délétion ou par surexpression du nouveau gène identifié, peut être réalisée. L'analyse comparée de l'expression spatio-temporelle de protéines interagissant participe aussi à la validation biologique des inter-

Tableau I (suite)

PRINCIPAUX RÉSULTATS OBTENUS PAR CLONAGE SUIVANT UNE MÉTHODE DOUBLE-HYBRIDE

APPAT				BANQUE d'ADNC				
nom	fonction	origine	clones positifs/criblés	clones positifs identifiés	confirmation de l'interaction	rôle connu ou supposé	remarque	référence
calmoduline	prolifération cellulaire localisation : appareil centriolaire	levure	2/3,3 10 ⁵	- ferrochélatase - Nuf1p/Spc110	- biochimie et génétique	- enzyme mitochondriale - protéine <i>coiled-coil</i> appareil centriolaire	- ? - colocalisation	[48]
cdk4	protéine kinase, régulation du cycle cellulaire	humain		- p16 ^{INK4}	- biochimie	inhibiteur de l'activité kinase de cycline D/cdk4	suppresseur de tumeur (MTS)	[53, 61]
cdk2	protéine kinase, régulation du cycle cellulaire	humain (HeLa)		- Cks 1 - Rbr-2 - Kap	- - biochimie → interaction indirecte, <i>via</i> cycline - biochimie	- homologue p13 Suc1 lié à cdc2 (<i>S. pombe</i>) - famille du rétinoblastome (Rb) = p130 associée à l'adénovirus E1A substrat de cdk2? - protéine phosphatase	- - pas d'interaction avec cdc2 ou cdk5	[52, 54]
		id.		- Cdi1 - Cks1 et 2	- biochimie - protéine phosphatase, cycle cellulaire - analogue p13 Suc1	- spécificité : interagit aussi avec cdc2, cdk mais pas cdk4	[8]	
		id.	14/2 10 ⁶	- Cip1 - Cip2	- biochimie	- inhibiteur de l'activité kinase de cycline/cdk2 - homologue phosphatase	- associé à des complexes cycline /cdK de fibroblastes	[51]
Rétinoblastome	suppresseur de tumeur, phosphorylée au cours du cycle cellulaire	humain (lymphocyte)	28/2 10 ⁶	- PP-1a2 (1 clone) - autres : inconnus	- biochimie	- protéine phosphatase	la même région de Rb lie PP-1a2 et l'antigène T de SV40	[52]
N recognin	dégradation protéines suivant la règle du N-term. levure	1/10 ⁵	Ubc2	biochimie et génétique	enzyme de conjugaison de l'ubiquitine	[47]		
Gag1 (HIV1)	assemblage des particules rétrovirales	humain (HL60)	2/5 10 ⁵	Cyp1 et Cyp2	biochimie	cyclophilines, fixent la cyclosporine A (immunosuppresseur)	<i>in vitro</i> , interaction déstabilisée par la cyclosporine A	[42]
SC35	facteur d'épissage (choix des sites d'épissage), motif RS présent	humain	142/2 10 ⁶ , 50 analysés	- U1-70K - U2AF - SC35	- biochimie - » - »	facteur d'épissage » »	motif RS » »	[40]

actions détectées : les deux protéines doivent être présentes au même moment et au même endroit ! Toutefois, même si une interaction n'est pas biologiquement significative, elle n'en est pas moins pertinente sur le plan physico-chimique. Ainsi un répertoire des interactions permises entre motifs protéiques peut être créé, qui pourrait avoir une valeur prédictive pour l'étude d'autres protéines, voire pour la conception d'inhibiteurs de certaines interactions. Le système double-hybride peut conduire non seulement à la mise en évidence d'une interaction protéique, mais aussi à une étude précise, par « biochimie *in vivo* », de l'interaction entre deux protéines ou même entre deux domaines d'une même protéine : les domaines d'interaction peuvent être tout d'abord cartographiés par délétion, puis une analyse plus précise peut être réalisée par recherche de mutants ponctuels. Par exemple, le domaine d'homodimérisation de l'intégrase du virus HIV de type 1 a été défini par sélection de délétions qui n'altéraient pas l'interaction [64]. De même, l'étude de mutations ponctuelles du suppresseur de tumeur p53 a permis d'identifier les acides aminés jouant un rôle clef pour son interaction avec l'antigène T de SV40 [65].

À partir d'une première mutation qui conduit à une perte d'interaction, on peut également rechercher des mutations compensatoires chez le partenaire de la protéine initialement mutée [37].

Parallèlement, une dernière perspective ouverte par l'utilisation du système des deux hybrides est la recherche de substances qui inhiberaient, *in vivo*, l'interaction entre deux protéines données, interférant ainsi avec le processus biologique dans lequel elles sont impliquées. On peut aisément imaginer les applications d'une telle approche à la recherche de nouveaux médicaments ! En conclusion, le test double-hybride permet non seulement la mise en évidence directe, *in vivo*, chez la levure, d'interactions protéiques mais aussi l'analyse de ces interactions. Il apparaît comme complémentaire des approches biochimiques et génétiques.

Sa puissance réside à la fois dans sa sensibilité et dans le fait qu'il permet de cloner directement un gène codant pour un nouveau partenaire. Cette méthode illustre également l'apport de la confrontation entre différents domaines, *i.e.* celui de l'étude des facteurs de transcription et celui des interactions protéiques ■

Références

- Lassar BL, Davis RL, Wright WE, Kadash T, Murre C, Voronara A, Baltimore D, Weintraub H. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerisation with E12/E47-like proteins *in vivo*. *Cell* 1991; 66: 305-15.
- Settleman J, Narasimhan V, Foster LC, Weinberg RA. Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from Ras to the nucleus. *Cell* 1992; 69: 539-49.
- Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 1991; 251: 1211-7.
- Fields S, Sternglanz R. The two hybrid system. *Trends Genet* 1994 (sous presse).
- Guarente L. Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1639-41.
- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interaction. *Nature* 1989; 340: 245-6.
- Golemis E, Brent R. Fused protein domains inhibit DNA binding by LexA. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 3006-14.
- Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R. Cdi1, a human G1-Phase and S-Phase protein phosphatase that associates with cdk2. *Cell* 1993; 75: 791-803.
- Munder T, Furst P. The *Saccharomyces cerevisiae* CDC25 gene product binds specifically to catalytically inactive Ras proteins *in vivo*. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 2091-9.
- Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine threonine kinase Raf. *Cell* 1993; 74: 205-14.
- Takacs AM, Das T, Banerjee AK. Mapping of interacting domains between the nucleocapsid protein and the phosphoprotein of vesicular stomatitis-virus by using a 2-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10375-9.
- Diederich RJ, Matsuno K, Hing H, Artavanis-Tsakonas S. Cytosolic interaction between dextex and Notch ankyrin repeats implicates dextex in the Notch signaling pathway. *Development* 1994; 120: 473-81.
- Ruden DM, Ma J, Wood K, Patshne M. Generating yeast transcription activators containing no yeast protein sequences. *Nature* 1991; 650: 250-2.
- Vasavada HA, Ganguly S, Germino FJ, Wang ZX, Weissman SM. A contingent replication assay for the detection of protein-protein interactions in animal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10686-90.
- Fearon ER, Finkel T, Gillison ML, Kennedy SP, Casella JF, Tomaselli GF, Morrow JS, Dang CV. Karyoplasmic interaction selection strategy: a general strategy to detect protein-protein interactions in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7958-62.
- Chakraborty T, Martin JF, Olson EN. Analysis of the oligomerization of myogenin and E2A products *in vivo* using a two-hybrid assay system. *J Biol Chem* 1992; 267: 17498-501.
- Nallur GN, Vasavada HA, Sankhavaram PR, Xu WJ, Weissman SM. Evaluation of the contingent replication assay (CRA) and its application to the study of the general transcription initiation factor TFIIF. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3867-73.
- Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S. Elimination of false positives that arise in using the 2 hybrid system. *Biotechniques* 1993; 14: 920-4.
- Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang YZ, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ. The Retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase Type-1 catalytic subunit. *Genes Dev* 1993; 7: 555-69.
- Clark SG, Stern MJ, Horvitz HR. *C. elegans* cell-signaling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* 1992; 356: 340-4.
- Van Aelst L, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M. Complex-formation between Ras and Raf and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6213-7.
- Zhang X, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR, Avruch J. Normal and oncogenic p21^{ras} proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 1993; 364: 308-13.
- Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A. Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase. *Science* 1993; 260: 1658-61.
- Chardin P, Camonis JH, Gale NW, Vanaelst L, Schlessinger J, Wigler MH, Barsagi D. Human Sos1 — A guanine-nucleotide exchange factor for Ras that binds to Grb2. *Science* 1993; 260: 1338-43.
- Rozakis-Adcock M, Fernley R, Wade J, Pawson T, Botwell D. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 1993; 363: 83-5.
- Huang WD, Alessandrini A, Crews CM, Erikson RL. Raf-1 forms a stable complex with Mek1 and activates Mek1 by serine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10947-51.
- Li SF, Sedivy JM. Raf-1 protein-kinase activates the NF-Kappa-B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF-Kappa-B-I-Kappa-B complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9247-51.



28. Holt KH, Olson AL, Moyer-Rowley WS, Pessin JE. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is mediated by high-affinity interactions between distinct domains within the p110 and p85 subunits. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 42-9.
29. Lalo D, Carles C, Sentenac A, Thuriaux P. Interactions between 3 common subunits of yeast RNA polymerase-I and polymerase-III. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5524-8.
30. Dang CV, Barrett J, Villa-Garcia M, Resar LMS, Kato GJ, Fearon ER. Intracellular leucine zipper interactions suggest c-Myc hetero-oligomerization. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 954-62.
31. Finkel T, Duc J, Fearon ER, Dang CV, Tomaselli GF. Detection and modulation *in vivo* of Helix-Loop-Helix protein-protein interactions. *J Biol Chem* 1993; 268: 5-8.
32. Hoey T, Weinzierl ROJ, Gill G, Chen JL, Dynlacht-BD, Tjian R. Molecular-cloning and functional analysis of *Drosophila* Taf110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 1993; 72: 247-60.
33. Ferreri K, Gill G, Montminy M. The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1210-3.
34. Gill G, Pascal E, Tseng ZH, Tjian R. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Spl contacts the dTAFIII10 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 192-6.
35. Chevray PM, Nathans D. Protein-Interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5789-93.
36. Dowell SJ, Tsang JSH, Mellor J. The centromere and promoter factor-I of yeast contains a dimerization domain located carboxy-terminal to the bHLH domain. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 4229-36.
37. Hardy CFJ, Sussel L, Shore D. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev* 1992; 6: 801-14.
38. Legrain P, Chapon C, Galisson F. Interactions between Prp9 and Spp91 splicing factors identify a protein complex required in prespliceosome assembly. *Genes Dev* 1993; 7: 1390-9.
39. Legrain P, Chapon C. Interaction between Prp11 and Spp91 yeast splicing factors and characterization of a Prp9-Prp11-Spp91 complex. *Science* 1993; 262: 108-10.
40. Wu JY, Maniatis T. Specific interactions between proteins implicated in splice-site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 1993; 75: 1061-70.
41. Amrein H, Hedley ML, Maniatis T. The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by Transformer 2. *Cell* 1994; 76: 735-46.
42. Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP. Human-Immunodeficiency-virus type-1 GAG protein binds to cyclophilin-A and cyclophilin-B. *Cell* 1993; 73: 1067-78.
43. Bogerd HP, Fridell RA, Blair WS, Cullen BR. Genetic evidence that the TAT proteins of human-immunodeficiency-virus type-1 and type-2 can multimerize in the eukaryotic cell nucleus. *J Virol* 1993; 67: 5030-4.
44. Bogerd H, Greene WC. Dominant negative mutants of human T-cell leukemia-virus type-I rex and human-immunodeficiency-virus type-1 rev fail to multimerize *in vivo*. *J Virol* 1993; 67: 2496-502.
45. Brown NG, Costanzo MC, Fox TD. Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1045-53.
46. Lee JW, Moore DD. Isolation of cDNA clones encoding proteins that specifically interact with thyroid-hormone receptor. *J Cell Biochem* 1993; 51A: 218.
47. Madura K, Dohmen RJ, Varshavsky A. N-Recognin/Ubc2 interactions in the N-end rule pathway. *J Biol Chem* 1993; 268: 12046-54.
48. Geiser JR, Sundberg HA, Chang BH, Muller EGD, Davis TN. The essential mitotic target of calmodulin is the 110-kilodalton component of the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7913-24.
49. Valay JG, Simon M, Faye G. The Kin28 protein kinase is associated with a cyclin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 1993; 234: 307-10.
50. Kühne C, Linder P. A new pair of B-type cyclins from *Saccharomyces cerevisiae* that function early in the cell-cycle. *EMBO J* 1993; 12: 3437-47.
51. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The P21 Cdk-interacting protein Cipl1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-16.
52. Hannon GJ, Casso D, Beach D. KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependant kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1731-5.
53. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific-inhibition of cyclin-D/Cdk4. *Nature* 1993; 366: 704-7.
54. Hannon GJ, Demetrick D, Beach-D. Isolation of the Rb-related P130 through its Interaction with cdk2 and cyclins. *Genes Dev* 1993; 7: 2378-91.
55. Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9578-82.
56. Shrivastava A, Saleque S, Kalpana GV, Artandi S, Goff SP, Calame K. Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. *Science* 1993; 262: 1889-92.
57. Zervos AS, Gyuris J, Brent R. Mx11, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 1993; 72: 223-32.
58. Iwabuchi K, Li B, Bartel P, Fields-S. Use of the 2-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 1993; 8: 1693-6.
59. Yang XO, Hubbard EJA, Carlson M. A protein kinase substrate identified by the 2 hybrid system. *Science* 1992; 257: 680-2.
60. Fernandez-Sarabia MJ, Bischoff JR. Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. *Nature* 1993; 366: 274-5.
61. Kamb A, Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day III RS, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-9.
62. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, Neel BG, Birge RB, Fajardo JE, Chou MM, Hanafusa H, Schaffhausen B, Cantley LC. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993; 72: 767-78.
63. Zhang L, Bermingham-McDonogh O, Turcotte B, Guarente L. Antibody promoted dimerization bypasses the regulation of DNA-binding by the heme domain of the yeast transcriptional activator Hap1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2851-5.
64. Kalpana GV, Goff SP. Genetic analysis of homomeric interactions of human-immunodeficiency-virus type-1 integrase using the yeast 2 hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10593-7.
65. Li B, Fields S. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T-antigen by using the yeast 2 hybrid system. *FASEB J* 1993; 7: 957-96.

A. Plessis :

Laboratoire de génétique du développement et évolution, Institut Jacques-Monod, 4, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 5, France.

J.H. Camonis :

U.248 Inserm, Signalisation intracellulaire et oncogenèse, faculté de médecine Lariboisière-Saint-Louis, 10, avenue de Verdun, 75010 Paris.

Remerciements

Nous remercions Claudie Isnard, François Schweisguth, André Sobel, Catherine Reboux, Jean-Pierre Rousset et François Tronche pour leur lecture critique du manuscrit.

TIRÉS A PART

A. Plessis.



INFORMATIONS SFG

Réunions de la Société Française de Génétique

• Les **SOCIÉTÉS FRANÇAISE ET ISRAËLIENNE DE GÉNÉTIQUE** organisent un colloque binational en Israël du **6 au 13 novembre 1994**. Ce colloque bénéficie du soutien du ministère des Affaires étrangères et de l'AFIRST. Seront abordés tous les domaines de la génétique humaine fondamentale et médicale : maladies génétiques mono- et polyfactorielles, cytogénétique moléculaire, génétique du cancer, thérapie génique, génétique des populations et épidémiologie. Pour tout renseignement, contacter le secrétariat de la SFG c/Immunogénétique Humaine, Institut Pasteur, 25, rue

du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

• La **SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE GÉNÉTIQUE** et la **SOCIÉTÉ TUNISIENNE DE CHIMIE BIOLOGIQUE** organisent conjointement au **printemps 1995** à Hammamet (Tunisie) un colloque d'une semaine sur le thème **Diversité génétique** : Polymorphismes (plantes, animaux, homme) — Genèse et maintien de la variabilité génétique — Rôle dans l'évolution biologique — Rôle en pathologie (maladies génétiques, résistance aux maladies).

- Les participants français pourraient intervenir en alternance avec leurs col-

lègues tunisiens. Le séjour, pour un nombre limité de personnes, pourrait être pris en charge par le ministère tunisien de l'Environnement, de la Recherche et de la Jeunesse, le voyage étant à la charge des participants.

- Les personnes intéressées peuvent prendre contact avec l'organisateur, Alain Bucheton, Centre de Génétique moléculaire, Cnrs, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex — Tél. : (1) 69.82.32.77, Fax : (1) 68.82.43.83, avec Michel Solignac - Tél. : (1) 69.82.37.29 — Fax : (1) 69.07.04.21, le Professeur Mohamed Marrakchi, laboratoire de génétique, faculté des sciences de Tunis — Fax : (19) 216.1.885.480).

Autres réunions

• La prochaine réunion des drosophilistes de langue française « **2^e JOURNÉE DE GÉNÉTIQUE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE LA DROSOPHILE** » se tiendra, comme les années précédentes, au Centre omnisport de Vichy du **21 au 24 septembre 1994**. Le dossier d'inscription peut être obtenu

auprès d'Alain Bucheton, Centre de Génétique moléculaire, Cnrs, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex.

• La **Société Française de phytopathologie** organise du 30 novembre au 2 décembre 1994 à Montpellier un col-

loque « **HISTOLOGIE, ULTRASTRUCTURE ET CYTOLOGIE MOLÉCULAIRE DES INTERACTIONS PLANTES-MICROORGANISMES** ». Le dossier d'inscription peut être obtenu auprès de Michel Nicole, ORSTOM, laboratoire de phytopathologie, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex.

L'Association « Chercheurs Toujours » nous communique

La retraite entraîne dans nos structures une rupture complète avec les activités habituelles du chercheur. Tout se passe comme si, le jour de notre anniversaire, nous devenions brusquement inutiles et comme si nous perdions du jour au lendemain tout le savoir accumulé pendant toute une vie professionnelle. Nous étions un certain nombre à penser que c'était là une erreur et nous avons fondé l'association « Chercheurs

Toujours » (loi de 1901) avec l'objectif de promouvoir l'activité scientifique des chercheurs retraités. Après quatre ans d'existence, l'association compte une centaine de membres en France, de toutes disciplines et provenant de divers organismes de recherche — surtout du Cnrs — ainsi que 25 étrangers — États-Unis en majorité.

Indépendamment des organismes dont relevaient ses adhérents, trois idées

générales ont guidé la réflexion et l'action de « Chercheurs Toujours » :

— **ne pas laisser en friche le savoir accumulé qui peut encore présenter une utilité pour la Société et faciliter pour chacun une ouverture vers d'autres disciplines ;**

- **aider les collègues retraités ou préretraités à résoudre des problèmes pratiques et administratifs ;**

- **créer un cadre de rencontres pour évi-**



ter l'isolement pénible tant moralement que scientifiquement.

Dans cet esprit, diverses conférences-débats ont été organisées. Des articles que les revues *Science* (USA) et *Lancet* (G-B) ont consacré à « Chercheurs Toujours » ont amené des collègues étrangers à nous rejoindre. Sont également à l'étude des actions de soutien aux étudiants étrangers en France et des aides (missions, envois de livres et de matériels scientifiques) à des pays en voie de développement (Tiers-Monde ou Europe de l'Est).

Autre rôle important possible, suggéré par des collègues français ou étrangers : réfléchir sur la Science, son évolution et sa relation avec la Société et les Pouvoirs. Les retraités ont des connaissances scientifiques, l'expérience du « métier de la recherche », disposent de plus de temps et surtout sont libérés de pressions financières et administratives.

Très jeune, l'Association « Chercheurs Toujours » propose déjà des réponses à certaines demandes émanant

de retraités, bien d'autres restent en attente. Ces ambitions nécessitent des démarches connexes à diverses organisations existantes — « Chercheurs Toujours » s'y emploie mais n'y parviendra qu'avec le concours actif de ses adhérents.

• Renseignements, adhésion : s'adresser à : Mario Luzzati, « Chercheurs Toujours » ICIG Hôpital Paul-Brousse, 94800 Villejuif. Tél. : (1) 47.26.14.50 — Fax : (1) 47.26.80.97.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE GÉNÉTIQUE

DEMANDE D'ADHÉSION

Cette demande est à adresser au secrétaire général, Michel Solignac, laboratoire de biologie et génétique évolutives, bâtiment 13, Cnrs, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex. (Conformément aux statuts, elle sera soumise à l'approbation du Bureau lors de sa prochaine séance.)

NOM (Madame, Mademoiselle, Monsieur) :

PRÉNOM

DATE DE NAISSANCE : NATIONALITÉ :

FONCTION ET GRADE : ORGANISME DE RATTACHEMENT :

TITRES ET DIPLÔMES

ADRESSE PERSONNELLE* (adresse, téléphone) :

ADRESSE PROFESSIONNELLE* (centre ou université, laboratoire, adresse, téléphone, fax) :

DATE :

SIGNATURE :

Montant de la cotisation 1994 : 280 F

Pour les Étudiants (avantage financier limité à l'année d'adhésion) : 160 F par chèque bancaire ou postal libellé à l'ordre de la SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE GÉNÉTIQUE. Joindre la photocopie de la carte d'étudiant.

* Marquer d'une croix l'adresse professionnelle ou personnelle où doit être envoyé le courrier.