

COMMUNICATION

Influence du complexe érythrocytaire de pintade sur le génome de poules endogames Rhode Island Red

par Pierre LEROY

Une substance étrangère injectée de façon systématique à des Vertébrés Supérieurs, est-elle susceptible d'induire des modifications héréditaires ?

Dès 1950, les biologistes soviétiques avaient apporté des éléments de réponse à cette question ; des volailles injectées de sang d'autres volailles de race différente avaient donné des descendants à phénotype nouveau héréditaire. Ils en avaient déduit que, par ce procédé, l'on pouvait « ébranler » l'hérédité.

Cependant les esprits étaient mal préparés à accueillir cette conclusion. Bon nombre de biologistes et de généticiens refusaient encore leur confiance aux résultats d'AVERY et de ses collaborateurs. Ces auteurs avaient cependant montré (1944), après un travail expérimental de plus de dix ans, que les transformations bactériennes observées pour la première fois par GRIFFITH en 1927-1928, étaient dues à l'acide désoxyribonucléique renfermé dans le noyau bactérien. A en croire Franklin W. STAHL (1) l'importance de leur démonstration ne fut admise que près de dix ans plus tard. L'étrange technique des Russes si peu conforme aux lois de MENDEL et de MORGAN, si différente de la méthode d'AVERY, avait donc peu de chance d'être prise en considération ; à de louches manœuvres

(1) STAHL, The mechanics of inheritance. *Modern genetics series*, Prentice Hall Incorp. Englewood Cliffs, New Jersey, 1964.

politiques qui, deux ans plus tôt (1948), avaient jeté du discrédit sur les Russes, s'ajoutait l'insuffisance de leurs protocoles expérimentaux.

Personne à l'époque, n'imaginait que le sang d'oiseau pût altérer les gènes. On ne savait pas, non plus, à quel point les éléments organiques dépendaient les uns des autres et l'on ignorait la réalité de mutations vraies, au niveau moléculaire.

Aussi peu de chercheurs, en Occident, furent-ils tentés par ce genre d'expérience. Quelques Américains essayèrent, à leur manière, et n'enregistrèrent que des échecs ; cependant en Suisse, J. STROUN et, en France, QUATREFAGES et SABATIER, réussissaient à induire des modifications stables et héréditaires, à la suite d'injections de sang.

De notre côté, sensibilisé par les expériences du professeur J. BENOIT sur les canards traités à l'ADN, impressionné par les publications soviétiques qui relataient de nouveaux succès, nous nous décidions, en dépit de leur ambiguïté, à vérifier ces résultats surprenants. Nous devions nous mettre au travail sans hypothèse préalable et sans savoir ce que nous pourrions obtenir.

L'objet de la recherche était double : vérifier si le sang d'oiseau, injecté à des poules dont la stabilité génétique serait connue, exercerait une action modificatrice et deuxièmement voir si cette modification serait héréditaire.

Les installations de la ferme d'élevage à Gif-sur-Yvette présentaient les conditions favorables à un travail qui nécessitait le contrôle de tous les poussins et de leurs géniteurs. Les parquets de ponte furent organisés en fonction de cette exigence expérimentale.

LA SOUCHE DE POULETS UTILISÉS. LES TÉMOINS

Nous ne cherchions pas des sujets de « race pure » (ce qui n'existe pas) mais des sujets de souche sélectionnée et dont la stabilité génétique aurait été éprouvée. Le directeur de la Station Avicole Expérimentale du Magneraud (INRA) nous conseilla la souche M-44 de la race Rhode Island Red qu'il avait étudiée depuis 1948 ; il en avait fixé le phénotype. En 1957 il nous écrivait : « La Rhode Island Red M-44 est assez peu variable dans l'ensemble, sauf pour l'intensité de la coloration du duvet, qui peut aller jusqu'à la présence de traces noires, et pour l'intensité de la coloration du plumage. Cette variation est probablement due à une poussière de facteurs mélanisants non identifiables à cause de leur faible action individuelle. »

Nous faisons alors venir du Magneraud un lot de sujets RIR M-44 que nous avons observés dans notre élevage pendant trois années consécutives. La race est colorée, rouge acajou clair chez les femelles, foncé chez les mâles. Le noir est présent sur les ailes et les rémiges : il est peu étendu. Uniquement chez les femelles, on trouve parfois des noircissures localisées sur les plumes latérales à hauteur du trochanter. Cette souche homogène a été gardée à l'abri de toute contamination. Nous l'avons mise en reproduction endogame pendant toute la durée de l'expérience ; plus de 2.500 sujets sont nés dans notre élevage ; 300 autres, achetés au Magneraud ont complété notre lot de témoins. Tous, sans exception, ont présenté un phénotype très stable correspondant au standard de la souche.

LES DONNEURS DE SANG

La grande majorité des biologistes russes avaient injecté à des poulets, du sang de poulets de race différente : Australorp ou New Hampshire, Leghorn Blanc ou Sussex. Jean STROUN de son côté avait choisi la pintade pour en prendre le sang et l'injecter à des Leghorn Blanc. Nous avons préféré également la pintade, pour ses qualités d'endurance et de rusticité. Par ailleurs, assez éloignée de la poule par ses caractères génétiques, elle nous apparaissait plus susceptible de nous donner des résultats moins discutables.

Pour la même raison nous avons également utilisé le sang de faisan mâle et de dindon et avons éliminé la Leghorn Blanc pour prendre une race colorée, plus sûre et mieux connue des généticiens.

La partie la plus importante des expériences a été faite sur des Rhode Island Red injectées de sang de pintade ; le sang de faisan ou de dindon a permis de vérifier nos résultats et de les comparer entre eux.

TECHNIQUES UTILISÉES

Le sang est ponctionné aseptiquement à la veine sus-alaire et maintenu dans un bain froid. Mélangé à du sérum glucosé (5 à 10 p. 100) il est homogénéisé puis injecté à des poussins dès les premiers jours qui suivent l'éclosion. L'injection est faite par voie intrapéritonéale : la dose, d'abord de 0,5 ml par sujet et par semaine, augmente progressivement jusqu'à 10 ml. Le traitement se poursuit pendant plusieurs mois jusqu'à ce que chaque animal traité ait reçu de 180 à 200 ml.

Plus tard, le sang fut fractionné en sérum, plasma et complexe nucléaire. Chaque fraction a été injectée séparément. Les substances nucléaires sont obtenues après laquage des cellules par la saponine (2 g/l pendant 10 mn en chambre froide, puis centrifugation 8.000 t/mn pendant 10 mn). Elles représentent tout ce que contient le noyau en acides nucléiques, protéines, enzymes, acides aminés.

L'ADN extrait des érythrocytes a été également injecté. La préparation de l'ADN faite par R. VENDRELY a été décrite (Coll. Int. des ADN. Liège 27-30 sept. 1959).

Des embryons de RIR M-44 ont reçu, par injections intravasculaires, 0,3 ml de sang de pintade adulte, au douzième jour d'incubation.

Pour assurer des échanges sanguins plus durables, la circulation croisée entre receveur et donneur a été établie par parabiose des œufs en incubation.

Enfin la greffe embryonnaire de tube neural et d'ébauches de membres a été faite, de la pintade à des Leghorn Blanc, au cours de l'incubation.

SCHÉMA DE L'EXPÉRIENCE ET RÉSULTATS

Un lot de 50 poussins d'un jour Rhode M-44 à pedigree connu fut divisé en trois groupes : 10 témoins, 20 traités au sang de pintade, 20 au sang isologue (Rh. M-44 → Rh. M-44).

Devenus adultes, les sujets de chaque catégorie furent mis en reproduction entre eux. Ni les descendants des témoins, ni ceux des poulets traités au sang isologue ne montrèrent de modification du phénotype. En revanche 20 p. 100 des descendants de sujets injectés de sang de pintade présentaient un plumage noir plus ou moins accentué mais inconnu dans la souche M-44.

Nous avons réduit à trois les degrés de mélanisation : noir irisé (NI) ; noir proprement dit (N) sans irisation ; légèrement modifié (LM). Dans ce dernier cas, la pigmentation noire ne couvre pas toute la surface de la plume, mais est répartie de façon plus ou moins régulière sous forme de taches bien délimitées ; parfois elle est réduite à une poussière noirâtre sur des zones différentes de celles où on peut la trouver chez la femelle non traitée.

Les sujets F1 issus de géniteurs *traités au sang de pintade* furent divisés en deux groupes : la lignée A et la lignée B. La première fut constituée par des sujets modifiés auxquels le sang de pintade ne fut plus injecté (lignée A) ; la seconde (lignée B) constituée au

départ de sujets modifiés, fut traitée comme l'avaient été les parents.

En revanche, la F1 issue de sujets *injectés de sang de Rhode M-44* (traitement isologue) n'a manifesté aucun changement du phénotype. Il en a été de même pour les générations suivantes. Ainsi l'injection de sang isologue s'est montré sans aucune action sur le plumage.

La lignée B. Les injections répétées de génération en génération ont provoqué des changements inattendus du coloris du plumage. En F2 40 p. 100 des survivants adultes sont modifiés. En F3, le pourcentage tombe ; bien que les géniteurs F2 aient été pris parmi les modifiés les plus accentués, 11 seulement des descendants F3 sont changés, ce qui représente 23 p. 100.

Mais c'est en F4 qu'apparaît le résultat le plus surprenant. Sur 94 poussins éclos 77 ont survécu. Leur phénotype adulte est redevenu celui de la Rhode M-44 ; on ne trouve plus de traces de mélanisation, sauf sur 5 d'entre eux très légèrement marqués de noir et que nous n'avons pas considérés comme modifiés.

Ce retour au phénotype d'origine est probablement dû, à un feed-back et non à un blocage génétique, car, en effet, les sujets F4 ou F5 mis au repos, retrouvent leur fécondité et donnent des descendants mélanisés.

La lignée A. De la F1 à la F12, les descendants des sujets traités en F0 se sont reproduits entre eux, sans avoir été soumis au traitement. La mélanisation s'étend de plus en plus : le nombre de sujets modifiés augmente progressivement. Dès la F5, tous sont modifiés, sans exception. Sans doute rencontre-t-on divers degrés de mélanisation, mais il n'est aucun descendant qui ne soit mélanisé. De plus, la taille est réduite, les pattes sont décolorées, la ponte est plus précoce, mais les œufs sont plus petits.

Un autre caractère distingue les Modifiés des Rhode M-44. Chez ces derniers le plumage juvénile est assez homogène (roux clair) parsemé de plumes à terminaison blanchâtre. Chez les Modifiés, les poussins très clairs portent fréquemment sur la face dorsale deux ou trois lignes noirâtres. Lorsqu'ils prennent leur plumage juvénile, le coloris est très mélangé de blanc, de roux, de noir, de brun et forme une mosaïque difficile à analyser.

Le sang de pintade a donc induit des modifications héréditaires. Nous ne pouvons pas affirmer que les mêmes résultats seraient atteints avec d'autres races ou d'autres espèces d'oiseaux. Il en va pour eux comme pour les bactéries ; une certaine « compétence »

est requise pour que l'opération réussisse. Les essais tentés par nous-mêmes sur la Leghorn Doré et la Wyandotte Blanc avec le sang de pintade n'ont donné aucun résultat. Cependant le sang de faisan ou de dindon a agi sur la Rhode M-44 comme le sang de pintade ; la mélanisation moins intense avec le sang de faisan, plus tardive avec le sang de dindon n'en est pas moins l'effet du sang injecté.

FRACTIONNEMENT DU SANG

Le plasma et le sérum injectés séparément sont restés sans effet, mais le complexe nucléaire isolé des érythrocytes et injecté par voie intrapéritonéale a provoqué les mêmes modifications que le sang total ; elles se sont transmises jusqu'à la 5^e génération. Cependant l'ADN préparé à partir des érythrocytes et injecté, une fois par semaine pendant près de 4 mois, à la dose de 1 mg par injection n'a agi ni sur les sujets traités, ni sur leurs descendants.

CONTRÔLE DES RÉSULTATS

Les croisements réciproques entre « Modifié » et Rhode M-44 ont permis de constater que la mélanisation se transmettait aussi bien par le mâle que par la femelle. Dans les lignées matroclines et patroclines on obtient des types modifiés, cependant le pourcentage (39,90 p. 100) est plus fort chez les matroclines que chez les patroclines (25,7 p. 100).

Le métissage entre « Modifié » et Wyandotte Blanc, Rhode M-44 et Wyandotte Blanc ou entre Orpington Noir et Rhode M-44 ou Orpington et Modifié, a montré de façon démonstrative que le génome des Modifiés était différent de celui des Rhode. La différence est particulièrement sensible sur les mâles dont le phénotype accuse une influence mélanique très accentuée.

Ces divergences sont confirmées par l'incompatibilité réciproque entre Rhode M-44 et « Modifié » ; la Rhode M-44 ne tolère pas le sang de « Modifié » ni le « Modifié » celui de la Rhode M-44 alors que les Rhode Island Red d'une autre souche supporte des quantités appréciables de sang de « Modifié » injecté par voie intrapéritonéale.

Les expériences que nous avons faites nous ont conduit à trois conclusions :

1^o Le sang de pintade n'affecte ni la Rhode M-44 ni la Wyandotte Blanc.

2° Le sang de Modifié sans effet sur le Modifié, la Wyandotte Blanc ou la Rhode Parmenter est toxique pour la Rhode M-44.

3° Inversement le sang de Rhode M-44, sans effet sur la Rhode M-44 et la Wyandotte Blanc n'est pas supporté par le « Modifié ».

L'examen des sérums et l'analyse électrophorétique des immun-sérums ont révélé des divergences dans la zone comprise entre l'albumine et les β -globulines, divergences confirmées entre les protéines sériques de la Rhode M-44 et du Modifié.

DISCUSSION

De l'ensemble des expériences réalisées, trois résultats majeurs se dégagent :

A) Le sang de pintade, injecté en quantité requise, induit chez la Rhode M-44 la mélanisation du plumage. Cette mélanisation est héréditaire.

B) La mélanisation est bloquée si les injections sont répétées sans interruption à chaque génération.

C) L'incompatibilité réciproque entre le sang de Rhode M-44 et celui de Modifié est manifeste.

Quelle explication peut-on envisager ? Nous nous bornerons à la discussion du phénomène de la mélanisation et de sa transmissibilité. Nos connaissances actuelles de l'avis des spécialistes consultés, ne nous permettent pas de décrire les mécanismes mis en jeu. Cependant plusieurs hypothèses ont été proposées : nous distinguerons celles qui ne mettent pas en cause les facteurs géniques et celles qui considèrent l'action d'un facteur X sur le génome.

1° *Le génome n'est pas modifié.*

Bien que cet énoncé contredise nos résultats, examinons les différentes explications que des auteurs ont avancées.

a) *L'action hormonale.* Certaines hormones sont susceptibles de modifier le coloris du plumage. GREENWOOD sur la Leghorn Doré a montré qu'un excès de thyroxine mélanisait la gorge des ♂ et dépigmentait celle des femelles. CARIDROIT (1938) a souligné l'action des stéroïdes sur la Rhode Island Red. Mis à part un cas unique de transmission à une seule génération de dépigmentation sous l'effet de la thyroxine (SAINTON et SIMONNET 1931), l'action

hormonale n'affecte que les sujets traités et non leurs descendants, ce qui ne correspond pas à nos résultats.

b) *La sélection artificielle.* Dans l'hypothèse d'une option préconçue, plusieurs années auraient été nécessaires avant d'obtenir un ou plusieurs couples présentant le phénotype désiré. Or dès la F1 issue de sujets injectés nous observons des modifications inattendues du coloris du plumage. Au cours de la reproduction endogame, les croisements ont pu favoriser la mélanisation ; en aucun cas ils ne l'ont provoquée. Signalons, en outre, qu'aucun des 2.800 témoins que nous avons examinés, n'a présenté une modification comparable. On comprend mal comment, dans ces conditions, on aurait pu envisager une sélection.

c) *Les effets prolongés.* Des modifications dues à un agent non mutagène et indépendantes des fonctions chromosomiques peuvent parfois se transmettre d'une génération à l'autre. Cette transmission est le fait de la femelle et non du mâle. Le retentissement du milieu sur l'hérédité est passager (DAVID, 1962). Nous ne pouvons pas accepter cette explication qui ne rend pas compte des faits observés dans nos expériences : en effet, le mâle transmet la modification et l'hérédité s'est maintenue sans défaillance pendant 12 générations.

2° *Le génome est modifié.*

a) *L'acide désoxyribonucléique (ADN).* Comme l'ADN est le vecteur des caractères héréditaires on peut logiquement penser que c'est lui qui peut être responsable des changements observés. Contenu dans le noyau des érythrocytes injectés il aurait exercé son action sur les cellules germinales des géniteurs.

Deux raisons cependant nous semblent s'opposer à cette manière de voir :

1° Nos essais d'injection d'ADN hautement polymérisé ont été négatifs, comme nous l'avons signalé au cours de cet exposé.

2° Jamais nous n'avons trouvé, chez les sujets modifiés, l'un des caractères des donneurs. Ces deux raisons ne sont cependant pas décisives. Après les expériences, récentes de MUNRO (1967-1969) qui est parvenu à imposer par l'ADN de poule Nègre-Soie injecté à des New Hampshire, la polydactylie des Nègre-Soie, on ne peut plus affirmer que l'ADN n'est jamais incorporé dans le noyau des sujets traités. L'expérience est à refaire. En ce qui concerne les

injections de sang nous pensons toutefois que l'agent modificateur se trouve dans le complexe nucléaire.

b) *La particule virale.* LWOFF et L'HÉRITIER ont suggéré que les résultats obtenus étaient dus à l'action d'un virus. Les analogies entre la mélanisation du plumage et diverses modifications provoquées chez les plantes et les animaux par un virus montrent que l'hypothèse ne peut pas être prise à la légère.

Toute une série d'expériences ; action du plasma, broyat de substances hématopoïétiques de pintade, parabiose, greffe de tube neural ou d'ébauches de membres, est restée négative. En admettant que l'on isole des virus spécifiques ou non de la pintade, il resterait à démontrer qu'ils ont non seulement une action mélanisante sur le plumage de la Rhode M-44 mais qu'ils entraînent en même temps d'autres phénomènes concomitants tels que le retour au phénotype d'origine et l'incompatibilité entre Modifié et Rhode M-44 pour lesquels jusqu'ici nous n'avons aucune explication à proposer.

CONCLUSION

Que conclure de cet exposé rapide ? Le fait, de beaucoup le plus important, est la transmission d'une modification imposée. Les injections répétées de sang total d'oiseau à d'autres oiseaux de genre et d'espèce différents peuvent, dans certaines conditions, induire chez les descendants des sujets traités des changements qui passent de génération en génération. Le milieu physiologique nouveau a exercé sur le germe des répercussions durables et a finalement créé une race que l'on peut croire fixée désormais.

La transmissibilité vérifiée au cours de douze générations successives, est compréhensible si l'on admet que le capital génétique des sujets traités a été atteint.

Comment ou de quelle manière le germe a-t-il été lui-même modifié ? Rien, jusqu'à présent, ne nous autorise à en avancer la raison. Les causes qui provoquent les effets obtenus sont encore l'objet de controverses. D'ores et déjà cependant, nous rejetons certaines explications qui ont été proposées. Nous savons, en effet, que c'est dans le noyau des érythrocytes que doit se trouver l'agent modificateur.

S'agit-il dès lors de l'ADN ou du complexe protéino-nucléique ? Rien ne nous permet de répondre. Les tout derniers travaux des biologistes indiquent que la synthèse des protéines que l'on croyait être la même chez tous les vivants et dont le point de départ était

l'ADN, n'est pas chez certains Vertébrés ce qu'elle est chez les bactéries. Il nous faut donc attendre des informations plus précises avant de nous prononcer.

Les travaux de MENDEL et ceux de MORGAN avaient, à leur époque bouleversé la biologie ; la biologie moléculaire, à son tour, transforme la génétique classique. Les observations que je vous ai présentées sont simples, mais elles posent cependant des problèmes difficiles. Plus on avance, plus on s'aperçoit de la caducité des théories. Ce qui demeure inexpugnable, ce sont les faits, c'est d'eux qu'il faut partir quitte à réviser nos assurances et à corriger sans cesse l'acquis non pour le démolir mais pour l'enrichir.

A ce prix la Science progresse : aux hommes d'en tirer le meilleur et non hélas ! le pire.
