

Médecine expérimentale

M. Jean DAUSSET, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Le cours n'a pas eu lieu.

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

*I. - L'Unité de Recherches
sur l'Immuno-génétique de la transplantation humaine
Unité I.N.S.E.R.M. U.93 (professeur Jean DAUSSET, Directeur)
Hôpital Saint-Louis, Paris.*

Elle a été centrée sur l'étude des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme (HLA) à l'aide des techniques de biologie moléculaire. Le laboratoire de l'Unité I.N.S.E.R.M. U.93 dispose d'un matériel humain exceptionnel grâce aux multiples volontaires qui ont accepté de venir régulièrement donner leur sang pour la recherche biomédicale. L'ADN a été extrait des leucocytes de ces sujets et soumis à des digestions différentes par plusieurs enzymes de restriction. Des sondes capables de s'hybrider avec les gènes HLA de classe I (HLA-A,B,C) et de classe II (HLA-DR et DQ) par leurs chaînes α et β ont été utilisées pour repérer les fragments d'ADN contenant tout ou une partie de ces gènes. Grâce à l'étude de 22 familles il a été possible de décrire les fragments de restriction ou allogénotopes provenant de chacun des 88 haplotypes HLA présents chez les 44 parents. Il a été observé qu'il existe un polymorphisme de l'ADN bien plus considérable encore que celui présentement défini par les méthodes sérologiques ou d'immunité cellulaire. Ceci indique que les sites de restriction que reconnaissent les enzymes sont extrêmement variables ; un site pouvant disparaître ou se déplacer au long de la molécule d'ADN. Ces sites peuvent être localisés dans les parties codantes des gènes (exons) mais aussi, et peut-être le

plus souvent dans les parties non codantes (introns et parties latérales des gènes). On a aussi noté que le polymorphisme des fragments de restriction présentait de nombreuses corrélations avec les épitopes sérologiquement définis suggérant que l'apparition de l'épitope et du site de restriction devaient provenir d'un événement génétique commun.

Ainsi on a pu établir un inventaire, certes encore provisoire et limité mais déjà important, des fragments de restriction obtenu avec six enzymes de restriction, concernant les gènes HLA de classe I (chaîne lourde) et de classe II (chaînes légère et lourde des molécules DR et DQ) et montrer qu'il n'y avait aucun des 88 haplotypes qui présentait la même combinaison de fragment de restriction. De plus il a été observé que le nombre de gènes est probablement différent d'un haplotype à l'autre. Ceci a été démontré pour le gène HLA-A qui est sans doute unique pour l'allèle HLA-A9 et d'un nombre plus élevé pour les allèles HLA-A19.

Ces recherches éclairent d'un jour nouveau notre conception de l'organisation du complexe majeur d'histocompatibilité et ouvrent de nouvelles perspectives.

La détermination des groupes HLA est désormais possible à partir d'un infime échantillon d'ADN grâce aux multiples corrélations existant entre allogénotopes et épitopes. Cette technique n'est réellement utile que dans les cas où le groupe tissulaire ne peut être réalisé par les méthodes classiques. Deux indications sont proposées et ont été utilisées. Dans l'hyperplasie congénitale surrénalienne (déficit en 21-OH) on peut désormais savoir dès la 8^e-10^e semaine de gestation si le fœtus a le même groupe HLA qu'un précédent enfant malade. Dans certains cas de déficit immunitaire sévère sans expression des antigènes HLA il est possible de déterminer le groupe HLA et ainsi de savoir s'il existe dans la famille un donneur de moelle compatible. Mais c'est surtout par l'étude des corrélations entre HLA et maladies que cette nouvelle technique peut rendre les meilleurs services. On sait que le diabète insulino-dépendant est fortement associé aux antigènes HLA-DR3 et DR4, alors que les individus HLA-DR2 sont rarement atteints. L'ADN de soixante-dix diabétiques et du même nombre d'individus normaux de même groupe HLA-DR a été analysé à l'aide de sondes DR β , DQ α et DQ β . Des différences statistiquement valables ont été observées entre les deux groupes. En particulier les malades DR4 se recrutent dans un sous-groupe de DR4 (DQR4). De même les rares malades DR2 se recrutent dans un sous-groupe très étroit de DR2 (DQR2.6). Il est intéressant de noter que les malades atteints de sclérose en plaque, maladie associée à HLA-DR2 se recrutent dans l'autre sous-groupe de DR2, celui qui protège contre le diabète. Ainsi peut-on grâce à l'étude du polymorphisme de l'ADN raffiner la corrélation avec HLA. On espère ainsi pouvoir définir précisément quelle est la formule DR β , DQ α , DQ β qui entraîne la suscepti-

bilité et celle qui au contraire procure la résistance, isoler et séquencer ces gènes.

Une seconde activité du laboratoire a été la création du Centre d'Etude du Polymorphisme Humain et son installation dans les nouveaux locaux du Collège de France au 3, rue d'Ulm. Le but de ce centre est de mettre à la disposition de la communauté scientifique nationale et internationale un matériel génétique permanent et commun, permettant ainsi d'établir plus rapidement la carte du génome humain. Ainsi les cellules des membres de cinquante familles de plus de quatre enfants et comportant souvent les quatre grands-parents ont été mises en cultures permanentes après transformation par l'EBV. L'ADN de ces cellules est donc disponible indéfiniment et théoriquement, en quantité illimitée. L'ADN de dix familles particulièrement intéressantes est déjà distribué d'une façon routinière à plus de 15 laboratoires dans le monde. Il s'agit d'un projet ambitieux qui a reçu l'aval des meilleurs spécialistes généticiens français et étrangers et qui ne fera que se développer. Un centre informatique puissant a été équipé, les programmes nécessaires écrits afin d'être prêt à accueillir prochainement les premiers résultats des études faites sur ce matériel exceptionnel.

CONFÉRENCIERS INVITÉS PAR LE LABORATOIRE

Newton E. MORTON, Université de Hawaii (U.S.A.) :

— Analyse de Ségrégation, Liaison et Association.

— Corrélation entre apparentés.

J. KLEIN, Max-Planck Institut de Tübingen (R.F.A.) :

— « Histoire naturelle » of the major Histocompatibility Complex (M.H.C.).

— Early events in immune response : what role does the M.H.C. play ?

E. ALBERT, Université de Munich (R.F.A.) :

— HLA Genetics : a) HLA segregation distortion : a statistical artifact ?
b) A method for the determination of leucocyte groups by family segregation.

— HLA and Diseases : a) Gene interaction in 21-OH hydroxylase deficiency. b) Double HLA associations, an indication for gene interaction also in juvenile diabetes, coeliac disease and juvenile chronic arthritis ?

STAGIAIRES ETRANGERS

Tiziana IRTI, Italie, Stagiaire de l'Association pour le développement de la Recherche sur le Cancer.

Elizabeth ROBBINS, U.S.A., Stagiaire du Sloan Kettering Institut de New York.

Karim OSAMA, Egypte, Stagiaire du gouvernement égyptien.

Zahida BUKARI, Pakistan, Stagiaire du gouvernement brésilien.

Masamichi AMANO, Japon, Stagiaire du gouvernement français.

Li Kuang CHEN, Chinois, Stagiaire de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

PUBLICATIONS

D. COHEN, J. DAUSSET, *HLA gene polymorphism* (Progress in Immunology V, Proceedings of the Vth Congress of Immunology, Kyoto, août 1983, Ed. Y. Tada, Acad. Press, pp. 1-12, 1983).

A. GOVAERTS, J. DAUSSET, *The major histocompatibility complex of man (HLA system)* (Immunohaematology, 1984, Ed. C.P. Engelfriet, J.J. van Loghem, A.E.G.K. van dem Borne, Elsevier Science, pp. 44-57, 1984).

J. DAUSSET, D. COHEN, *New perspectives in HLA and disease* (Major Histocompatibility System, Peter Gorer Symposium, Londres, 10 nov. 1983, Blackwell Publications, Oxford, pp. 84-98, 1984).

D. COHEN, J. DAUSSET, *Etude des gènes HLA par les enzymes de restriction* (*Act. Héma.*, 18^e série, pp. 14-21, mars 1984).

J. DAUSSET, D. COHEN, *Molecular genetics of the HLA system : New tools for the study of HLA and disease* (*Clinics in Immunology and Allergy*, vol. 4, n° 3, pp. 581-592, oct. 1984).

C. GELIN, L. BOUMSELL, J. DAUSSET, A. BERNARD, *The heterogeneity and functional capacities of human thymocyte subpopulations* (*P.N.A.S.*, 81, 4912-4916, 1984).

J. DAUSSET, J. HORS, *Immunogenetics of insulin-dependent juvenile diabetes* (*Diabetes Research*, 1, 115-123, 1984).

E.E. WOLLMAN, L. GUILHERM, V. LEPAGE, J. DAUSSET, *Non-HLA antigenic determinants : expression on activated T and B human lymphocytes (Tissue Antigens, 23, 1-11, 1984).*

D. COHEN, I. LE GALL, A. MARCADET, M.P. FONT, J.M. LALOUEL, J. DAUSSET, *Clusters of HLA class II β restriction fragments describe allelic series (P.N.A.S., 81, 7870-7874, 1984).*

J. DAUSSET, D. COHEN, *HLA at the gene level (Histocompatibility Testing 1984, Ed. E.D. Albert et al., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 22-28, 1984).*

A. MARCADET, D. COHEN, J. DAUSSET, A. FISCHER, C. GRISCELLI, A. DURANDY, *Genotyping using DNA probes in combined immunodeficiency syndrome with defective expression of HLA (New Engl. J. Med., 312, 1278, 1985).*

J.G. HENROTTE, C. HANNOUN, A. BENECH, J. DAUSSET, *Relationship between post-vaccinal anti-influenza antibodies, blood magnesium levels and HLA antigens (Human Immunology, 12, 1-8, 1985).*

O. COHEN-HAGUENAUER, E. ROBBINS, C. MASSART, M. BUSSON, I. DESCHAMPS, J. HORS, J.M. LALOUEL, J. DAUSSET, D. COHEN, *A systematic study of HLA class II β DNA restriction fragments in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) (P.N.A.S., 1985, 82, 33-35, 1985).*

A. GOVAERTS, J. GONY, C. MARTIN-MONDIERE, J.C. POIRIER, M. SCHMID, E. SCHULLER, J.D. DEGOS, J. DAUSSET, *HLA and multiple sclerosis : population and families study (Tissue Antigens, 25, 187-199, 1985).*

THÈSE

D.E.R.B.H. soutenu en décembre 1984 : Pascale PAUL, « Polymorphisme des gènes de Classe I », Université Paris VII.

MISSIONS ET CONFÉRENCES

— 34^e assemblée des Prix Nobel (Lindau, R.F.A.), 25-27 juin 1984 (conférencier invité).

— Centre Hospitalier et Universitaire de Brest, 5 juillet 1984 (conférencier invité).

— Fédération Européenne d'Immunogénétique (Strasbourg), 6-9 mars 1984 (président).

— Réunion de l'Association des Donneurs bénévoles d'organes et de tissus humains, 5 à 8 juin 1984 à Lyon.

— Centre d'Etude du Polymorphisme Humain : Création du Comité de consultants (Paris), 1^{er} octobre 1984 (président).

— XX^e Anniversaire de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Paris), 27 octobre 1984 (intervenant).

— Institut Behring (Marburg), 30 octobre 1984 (conférencier invité).

— Dialogo. Réunion franco-espagnole de néphrologie (Madrid), 17 novembre 1984 (conférencier invité).

— Journées Nationales d'Ethique, 6 et 7 décembre 1984.

— Forum : Medico-Clinico 2 000 (Milan), 29 décembre 1984 (conférencier invité).

— Colloque Génétique : Procréation et Droit (Paris), 18, 19 janvier 1985 (rapporteur).

— Colloque sur la Médecine Prédictive, organisé par le Mouvement Universel de la Responsabilité Scientifique (Rabat), 4 avril 1985 (président).

— Lecture Blumenthal : « Molecular studies of HLA : their implications » (Minneapolis, Minnesota, U.S.A.), 11 avril 1985 (conférencier invité).

— Colloque Ethique et Biologie des pays industrialisés (Rambouillet), 18-22 avril 1985, Rapport sur la médecine prédictive.

— Comité Consultatif National d'Ethique pour les Sciences de la Vie et de la Santé. Rapport sur le diagnostic prénatal et périnatal et le diagnostic d'une prédisposition (Paris), 13 mai 1985.

— Dix-septième Cours International de Transplantation et d'Immunologie Clinique (Lyon), 20-22 mai 1985 (conférencier invité).

— Congrès National d'Hématologie (Bordeaux), 22 mai 1985 (Président de séance).

— Hôpital Cantonal de Genève, Département d'Immunologie, 23 mai 1985 (conférencier invité).

— International Seminar on Graft versus Host Disease (Royaumont), 20-21 juin 1985 (Président de séance).

— VII Steno Symposium (Copenhague), 12-14 mai 1985 (conférencier invité).

*II. - Laboratoire de Médecine Expérimentale, Collège de France
Unité I.N.S.E.R.M. U 112 (D^r Françoise HAGUENAU, directeur)*

Les travaux du Laboratoire de Médecine Expérimentale ont été centrés sur l'étude des lignées cellulaires humaines cancérisées par un virus oncogène aviaire : le virus du Sarcome de Rous (RSV).

La preuve a d'abord été apportée que dans ces cellules — dont nous avons montré déjà l'infectiosité (production de virus) et le potentiel cancéreux (induction de tumeur chez la souris nude) — le génome viral était bien intégré.

En effet nous avons obtenu à partir de deux lignées de fibroblastes diploïdes humains des cellules clonées, nous avons hybridé leur DNA en utilisant des sondes dont l'une correspondait au génome entier du RSV, l'autre au gène sarc (qui on le sait code pour une protéine probablement seule responsable de la cancérisation) nous avons démontré qu'il y avait bien effectivement intégration du DNA viral dans le génome de ces cellules humaines.

Nous avons en outre pu analyser en détail les séquences intégrées et détecter à la fois l'oncogène viral (v-sarc) et l'oncogène cellulaire (c-sarc).

En même temps que leur matériel génomique nous avons examiné dans ces fibroblastes humains transformés la production de la protéine du gène sarc viral (pp60 v-sarc) et montré qu'elle était présente en quantité comparable à celle que l'on met en évidence dans des cellules transformées chez le poulet. Nous avons montré aussi que la protéine cellulaire homologue de la pp60 v-sarc : la protéine c-sarc était plus abondante dans les cellules humaines normales que dans les cellules aviaires.

Ainsi les caractéristiques de ce modèle de laboratoire, exceptionnel puisqu'il offre un système humain de cellules cancérisées par un virus avec un contrôle parfait de cellules normales issues du même donneur, ces caractéristiques se précisent et à mesure le système devient de plus en plus promoteur.

En effet du point de vue de leur caryotype l'examen cytogénétique en banding G, R et Q de toutes les cellules des deux lignées transformées ainsi que celles de plusieurs autres lignées clonées qui en sont dérivées ont montré une hétéroploïdie allant de 47 à 54 chromosomes et la *présence constante d'un chromosome impair de grande taille* et caractéristique. Ces anomalies chromosomiales de nombre et de structure apparaissent simultanément à la transformation de la culture.

Ces faits, la présence d'un chromosome marqueur en particulier, sont comparables à ceux observés dans de nombreux types de cancers et leu-

cémies che l'Homme. Ils retiennent particulièrement l'attention à l'heure actuelle parce qu'une concordance a pu être établie entre certaines aberrations chromosomiques, la position des c-onc dans les chromosomes et les lieux de translocation, de délétion ou duplication qui surviennent dans plusieurs types de leucémies et cancers. Ils nous invitent à une étude des translocations ou autre modification survenue lors de la cancérisation de notre propre modèle, ce qui est déjà commencé.

L'intérêt de ce modèle est encore souligné par les résultats que nous avons obtenus en étudiant les antigènes d'histocompatibilité à la surface des cellules normales et transformées.

Une étude des antigènes HLA Classe I a été réalisée avec non moins de 6 techniques combinées de sérologie, immunologie, cytologie au microscope conventionnel et au microscope électronique, biochimie qui toutes ont montré une diminution de ces antigènes dans les cellules transformées.

Ces données corroborent celles rapportées dans des cancers épithéliaux humains où une diminution ou disparition des antigènes d'histocompatibilité de Classe I a également été observée. La portée de ces observations et leur signification par rapport à la susceptibilité des cellules de notre organisme vis-à-vis du cancer devra être précisée.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE
DU COLLÈGE DE FRANCE

G.C. RABOTTI, B. TEUTSCH, M. MARILLER, J. AUGER, N. PAVLOFF et M. SEMMEL, *Transformation of human diploid fibroblasts with avian sarcoma virus replicating in human cells* (Présentation au XV Meeting of European Tumour Virus Group à Urbino, Italie, les 19-24 septembre 1984).

G.C. RABOTTI, M. MARILLER, B. TEUTSCH, M. SEMMEL, N. PAVLOFF, *Provirus integration and expression in ASV transformed human diploid fibroblasts* (Présentation au RNA Tumor Virus Meeting, Cold Spring Harbor, U.S.A., 20-26 mai 1985).

G.C. RABOTTI, B. TEUTSCH, M. MARILLER, J. AUGER, N. PAVLOFF et M. SEMMEL, *Provirus integration and expression in human cells transformed by avian sarcoma virus, partial characterization in progeny virus* (accepté par *Journal of General Virology*).

A. GOVAERTS et J. PHILIPPE, *Présence d'un marqueur chromosomal caractéristique dans deux lignées fibroblastiques humaines transformées par le*

virus du sarcome de Rous (Colloque I.N.S.E.R.M. « Génétique Moléculaire et Pathologie », Angers, 17-19 janvier 1985).

Dans le cadre des Journées de l'Institut de Biologie, les panneaux suivants ont été présentés :

— Morphologie Ultrastructurale de quelques rétrovirus, F. HAGUENAU et F. MONGIAT.

— Cancérisation de fibroblastes diploïdes humains par un virus sarcomatogène aviaire, G. RABOTTI, B. TEUTSCH, M. MARILLER, F. MONGIAT et J. AUGER.

— Présence d'un marqueur chromosomal caractéristique dans deux lignées fibroblastiques humaines transformées par le virus du sarcome de Rous, A. GOVAERTS et J. PHILIPPE.

— Disparition ou diminution des antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité de la poule dans des fibroblastes transformés par le virus du sarcome de Rous, D. GILMOUR et J. GOGUSEV.

— Analyse des molécules HLA de fibroblastes humains normaux et transformés par le virus du sarcome de Rous (RSV), G. SUSKIND et J. GOGUSEV.

— Persistance de l'antigène HLA classe I dans des fibroblastes humains transformés par le virus du sarcome de Rous, G. SUSKIND et J. GOGUSEV.

MISSIONS ET CONFÉRENCES

Le Docteur Françoise HAGUENAU s'est rendue au XV^e Congrès du European Tumour Virus Group à Urbino (Italie), les 18-25 septembre 1984.

Elle a assisté au Colloque de la Société Française de Microscopie Electronique qui s'est tenu à Strasbourg les 27-31 mai 1985.

Le Docteur G.F. RABOTTI a fait une communication au XV^e Congrès du European Tumour Virus Group à Urbino (Italie), les 18-25 septembre 1984.

Il a également fait une communication au RNA Tumor Virus Meeting à Cold Spring Harbor (U.S.A.), les 20-26 mai 1985.

M^{me} F. MONGIAT s'est rendue au Colloque de la Société Française de Microscopie Electronique, à Strasbourg, les 27-31 mai 1985.

CHERCHEURS ET PROFESSEURS ÉTRANGERS

Professeur Douglas GILMOUR, New York University Medical Center (U.S.A.).

Professeur André GOVAERTS, du Centre de Transfusion Sanguine de Bruxelles (Belgique), Professeur à la Fondation de France.

Professeur Gerald SUSKIND, du National Cancer Institute de Bethesda (U.S.A.).