

Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Le cours de cette année a été consacré à l'emploi des cultures de cellules dans l'étude de la différenciation cellulaire. Le problème de la différenciation cellulaire consiste à comprendre comment, à partir d'une seule cellule, l'œuf fécondé, émergent selon un programme précis dans le temps et dans l'espace, des lignées de cellules différant par leurs fonctions, leurs morphologies et leurs propriétés. Au point de vue biochimique, ce problème peut être formulé de la manière suivante : comment des cellules possédant le même génome, la même séquence nucléique dans leurs chromosomes, en viennent-elles à synthétiser des jeux de protéines différentes qui leur confèrent des propriétés différentes ? Cette manière de voir, qui est aujourd'hui admise par l'ensemble des biologistes, repose à peu près exclusivement sur un seul argument : celui fourni par les expériences de transplantation nucléaire effectuées sur les amphibiens depuis les années 50, notamment par Briggs et King, puis par Gurdon. Si l'on désigne par l'expression de « message génétique » l'ensemble des instructions chiffrées dans les chromosomes d'un organisme, il faut admettre l'existence de « programmes » différents correspondant à l'expression de certains segments de ce message : programmes pour les cellules musculaires, ou hépatiques, ou nerveuses, etc.

La différenciation cellulaire ne peut alors se concevoir que comme résultant d'interactions entre le noyau et le cytoplasme. Les types de molécules qu'une cellule synthétise, à n'importe quel moment du développement embryonnaire, doivent être déterminés en partie par des facteurs hérités de la cellule-mère, en partie par des facteurs intervenant sur la cellule depuis sa naissance jusqu'à sa division. Au début du développement embryonnaire s'établissent progressivement des lignées de cellules. Les groupes et sous-groupes de cellules précurseurs qui constituent ces lignées sont les ancêtres obligatoires des cellules qui présentent une différenciation terminale correspondant à ce qui est décrit dans les manuels d'histologie. En simplifiant à l'extrême et pour la commodité de l'exposé, on peut distinguer deux étapes dans les processus qui conduisent à l'ap-

parition de cellules à différenciation terminale. La première étape s'accomplit au cours des mitoses accompagnant la formation de lignées et sous-lignées ; elle aboutit à la formation de cellules « *déterminées* », c'est-à-dire de cellules, comme les myoblastes ou les neuroblastes, qui n'ont pas encore acquis les caractéristiques d'une différenciation terminale, mais n'en sont pas moins programmées pour donner un type et un type seulement de différenciation terminale. L'autre étape correspond à l'*expression* de ce programme, c'est-à-dire, par exemple, la transformation de myoblastes en myotubes. De toute évidence, c'est le premier de ces processus, la mise en place d'un programme particulier, plutôt que son expression, qui constitue l'aspect le plus important de la différenciation et le plus difficile d'accès. Le véritable problème, c'est de savoir comment, après une série de mitoses, certaines cellules acquièrent *pour la première fois*, la capacité de produire les molécules qui caractérisent un neurone ou un myotube. Malheureusement, et sauf très rares exceptions dont il ne sera pas question cette année, les cultures de cellules ne permettent le plus souvent d'étudier que l'expression d'un programme donné et, bien entendu, l'état de différenciation terminale.

Dans la première partie du cours, on a discuté, à l'aide d'exemples, les renseignements que peuvent ainsi apporter les cultures de cellules différenciées. Ces cultures ont une déjà longue histoire. Celle-ci commence en 1907, quand Harrison réussit à maintenir en culture des explants provenant de tubes neuraux d'embryons de grenouille. Il observe une croissance des fibres nerveuses en accord avec la théorie neuronale du réseau nerveux proposée par His et par Cajal. En éliminant définitivement l'idée de fibres nerveuses se développant à la manière d'un syncytium sans unités discrètes, ces expériences viennent étayer la représentation moderne de l'organisation structurale du système nerveux. Différents types de tissus sont alors mis en culture. En particulier du placenta humain, ce qui permet à Gey et ses collaborateurs de montrer que la source principale de gonadotrophine chorionique n'est pas maternelle comme on l'avait cru jusqu'alors, mais fœtale, ces cellules d'origine placentaire continuant à produire de l'hormone en culture. Depuis la guerre, nombre de types tissulaires ont ainsi été mis en culture. Peu à peu s'est développée une technologie assez complexe qui a permis de cultiver, non plus des explants, mais des cellules dispersées, ce qui présente des avantages évidents pour l'étude de la différenciation. Mais à mesure que se perfectionnaient les techniques, se précisait aussi une difficulté déjà notée par Champy avant la première guerre : une fois mises en culture, la plupart des cellules perdent leurs caractères spécifiques et cessent de ressembler au tissu d'origine. Cela conduit à l'inquiétante question de savoir si les cellules en culture ont les mêmes propriétés que dans l'organisme. Car il est bien évident que si non, les cellules dissociées en culture représentent une forme nouvelle et peut-être intéressante de microorganismes ; mais qu'elles ne présentent alors pour l'étude de la différenciation qu'une valeur limitée.

Pour qu'elles nous intéressent, il faut que ces cellules conservent en culture au moins certaines des propriétés de différenciation qui les caractérisent dans l'organisme.

En pratique, trois solutions sont alors offertes :

— ou bien on accepte de travailler sur une seule cellule qui reste différenciée sans se multiplier. Par exemple, un neurone dans lequel on peut introduire une électrode pour en étudier certaines propriétés électrophysiologiques, ou encore un lymphocyte dont on étudie les propriétés et les synthèses de gamma-globulines par certaines méthodes, comme la formation de plages ;

— ou bien, on utilise certaines cellules « précurseurs » qui sont déjà programmées mais n'ont pas encore exprimé leur différenciation terminale. C'est le cas, par exemple, des myoblastes que l'on peut obtenir à partir de muscles provenant d'animaux nouveau-nés, poulets ou mammifères. Dans des conditions de cultures convenables, ces myoblastes se multiplient pendant un certain temps puis, de manière plus ou moins synchrone, fusionnent pour produire des myotubes. A partir de telles cultures primaires de rat ou de souris, on peut même obtenir des lignées stables, ainsi que l'a montré Yaffé. Selon les conditions de la culture, la nature du milieu, la concentration en ions Ca^{++} , les cellules de ces lignées peuvent, soit se multiplier indéfiniment sous forme de myoblastes, soit au contraire fusionner pour donner naissance à des myotubes ;

— ou bien enfin, on utilise des cellules dérivées de tissus tumoraux, car obtenir en culture des lignées stables est souvent plus aisé à partir de tumeurs que de tissus sains. Malheureusement, et pour des raisons qui ne sont pas toujours claires (sélection, réarrangements chromosomiques, pertes de segments génétiques, déséquilibres géniques, etc.), il est rare que les cellules obtenues après établissement de lignées stables conservent les propriétés de différenciation que possèdent souvent les tumeurs dans l'organisme. Pour éviter cette difficulté, Sato et ses collaborateurs ont mis au moins une méthode qui permet de sélectionner des lignées de cellules ayant conservé certaines au moins des propriétés de différenciation caractérisant le tissu d'origine. Ces expériences reposent sur les principes suivants. Il s'agit tout d'abord, sur le type de tissu choisi, d'obtenir une tumeur transplantable dite « fonctionnelle », c'est-à-dire possédant certaines des propriétés du tissu d'origine, la production d'une hormone par exemple. A partir d'une telle tumeur, la sélection est effectuée par passages alternés en culture et sur l'animal. En effet, quand une telle tumeur est pour la première fois placée en culture, les cellules différenciées se multiplient le plus souvent assez mal et le tissu fibreux, qui se trouve toujours là, possède un avantage sélectif considérable et l'emporte très vite. En réinjectant cette culture dans l'animal, au contraire, on élimine le tissu fibreux qui n'est pas tumoral et on redonne un avantage aux cellules tumorales. Ainsi, d'un côté, on obtient des cellules de mieux en mieux adaptées à la croissance en culture ; de l'autre, on élimine les cellules banales qui contaminent, en quelque sorte,

les cellules différenciées. Bien entendu, à chaque passage, on vérifie la présence des propriétés de différenciation auxquelles on s'intéresse. Cette méthode semble d'une application assez large. Elle a permis à Sato et ses collaborateurs d'obtenir toute une série de lignées cellulaires différenciées à partir de tumeurs de l'hypophyse, de la corticosurrénale, de la glande mammaire, de l'ovaire, du testicule, de la glie, etc.

Pour chacune de ces trois méthodes permettant d'obtenir en culture des cellules différenciées, un exemple a été étudié en détail : cellules de muscle cardiaque, myoblastes et cellules de neuroblastome respectivement.

Dans la seconde partie du cours, on a discuté les renseignements que peuvent apporter les hybridations entre cellules présentant des différenciations distinctes. Ces hybridations se prêtent à deux sortes d'expérimentation. La première, qui a été utilisée en particulier par Ephrussi et ses collaborateurs, vise à récolter, les clones viables obtenus par hybridation et à en analyser les caractéristiques. On utilise le plus souvent deux types cellulaires qui diffèrent entre eux, non seulement par des caractères de différenciation, mais aussi par certains marqueurs génétiques permettant de sélectionner les produits de fusion : par exemple, résistance à l'azaguanine et à la 5-Bromodeoxyuridine qui se prêtent à une sélection en milieu HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine). Aussitôt que les clones ont atteint une taille suffisante, on en établit le caryotype et on recherche si les fonctions de différenciation caractérisant les cellules parentales y sont exprimées. En sous-clonant les populations hybrides ainsi obtenues, on suit en parallèle, d'une part l'évolution du caryotype et la perte de certains chromosomes et, d'autre part, l'évolution des fonctions de différenciation. Le but recherché est de pouvoir établir une corrélation entre la présence d'un chromosome particulier et l'expansion (ou la non expression) d'une fonction particulière.

On observe alors plusieurs types de réponse. La plus fréquente est « l'extinction », c'est-à-dire la non expression, de la fonction étudiée chez l'hybride. C'est ce qui a été observé notamment pour la synthèse de mélanine, d'hormone pituitaire de croissance, de protéines S 100, etc. Dans certains cas, on observe, après une période d'extinction, la réexpression de la fonction étudiée, réexpression qui accompagne la perte de certains chromosomes. C'est ce qui a été observé par Ruddle et ses collaborateurs pour la synthèse d'une estérase insensible à l'ésérine et par le groupe d'Ephrussi et Weiss pour la synthèse d'une série d'enzymes par des cellules d'hépatome. Dans d'autres cas, au contraire, la fonction spécialisée paraît exprimée dans les cellules hybrides contenant les deux jeux de chromosomes parentaux. C'est ce qui a été observé par exemple par Nirenberg et ses collaborateurs pour les propriétés électriques de membrane dans les hybrides entre cellules de neuroblastomes et fibroblastes de souris ; ou encore par Mohit et Fan pour la synthèse de chaînes d'immunoglobuline entre cellules de myélome et fibroblastes de souris. Dernière possibilité enfin :

l'induction d'une synthèse spécifique. Cela a été observé par M. Weiss dans le cas de la synthèse d'albumine par certains hybrides entre cellules d'hépatomes de rat et fibroblastes de souris. Ces expériences montrent, une fois de plus, l'importance de la dose de gènes spécifiques et de leur équilibre dans l'expression ou la non expression d'une fonction différenciée. Elles ne disent rien, jusqu'à présent, sur les mécanismes en jeu.

Le second type d'expériences rendues possibles par les phénomènes d'hybridation a été principalement utilisé par H. Harris et ses collaborateurs. Il consiste à étudier, non plus les propriétés de clones viables que l'on peut récolter après de nombreuses générations cellulaires, mais la série des événements qui surviennent chez les hétérocaryons aussitôt après la fusion cellulaire. Ces expériences mettent en jeu deux sortes de cellules : d'un côté des cellules capables de se multiplier activement, lignées HeLa ou L établies en culture ; de l'autre, des cellules à capacité de synthèse très limitée, comme les macrophages de lapin, les lymphocytes de rat ou surtout les érythrocytes de poulet. En hybridant ainsi cellules HeLa et érythrocytes de poulet, on obtient des hétérocaryons où l'on repère aisément les deux types de noyau. Par diverses techniques, on constate alors que le noyau d'érythrocyte dont les synthèses en acide nucléique sont nulles, est réactivé en quelque sorte dans les hétérocaryons et se met à synthétiser ARN et ADN. On observe des phénomènes analogues en énucléant tout d'abord les cellules HeLa par traitement à la cytochalasine B, puis en fusionnant ces cellules énucléées avec des érythrocytes de poulet.

Le processus de réactivation a été analysé en détail par le groupe de Ringertz. On peut distinguer toute une série d'étapes : changements des propriétés physico-chimiques de la chromatine, synthèse de RNA, apparition d'un nucléole. La plus intéressante est l'apparition dans le noyau, et avant toute synthèse d'ARN, de protéines en quantités importantes. En utilisant des antisérums spécifiques pour les protéines nucléaires humaines, on constate que le noyau de poulet se charge de protéines humaines qui vont y occuper la place même (nucléole ou nucléoplasme) qu'elles occupent dans les noyaux d'origine humaine. Après quatre ou cinq jours, on voit apparaître dans le noyau HeLa comme dans le noyau d'érythrocyte des protéines reconnues d'origine poulet par leurs propriétés antigéniques. L'activation du noyau d'érythrocyte semble donc être la conséquence d'un processus très spécifique dans lequel certaines protéines, celles existant normalement dans les noyaux humains, sont concentrées dans les noyaux de poulet. Cette spécificité peut correspondre, soit à une pénétration sélective à travers la membrane nucléaire, soit à une fixation spécifique sur la chromatine.

Tout se passe donc comme si c'était la fixation de protéines nucléaires spécifiques qui entraînait la réactivation du noyau d'érythrocyte. On peut donc se demander quel est le programme de synthèse dans ces noyaux réactivés ; ou, en d'autres termes, quel est le phénotype exprimé par ces noyaux. S'agit-il du

phénotype initial, c'est-à-dire érythrocyte ? Ou d'un phénotype « indifférencié » ? On encore le noyau d'érythrocyte est-il « reprogrammé » pour exprimer un phénotype semblable à celui de l'autre cellule utilisée pour la fusion ? Chez les hétérocaryons, la synthèse d'hémoglobine semble être résiduelle et diminue rapidement, ce qui exclut la première de ces hypothèses. Pour mettre la troisième à l'épreuve, des érythrocytes de poulet ont été hybridés avec des myoblastes de rat. Si les noyaux d'érythrocytes se voyaient imposer un programme de myoblaste, on devrait, dans les myotubes formés, trouver de la myosine, non seulement de rat, mais de poulet que l'on peut identifier par des méthodes immunologiques. Les résultats préliminaires rapportés par Ringertz indiquent que tel n'est pas le cas, seule la myosine de rat étant formée dans ces myotubes.

Malgré ce résultat négatif, ce type d'expérience présente un intérêt considérable. Il permet, en effet, une analyse des protéines qui, d'une manière ou d'une autre, jouent un rôle dans les activités nucléaires. Il peut éventuellement permettre de modifier le « programme de différenciation » d'un type cellulaire dans une direction choisie. Mais il faut souligner une fois encore que si ces expériences avec des cultures cellulaires peuvent apporter des renseignements précieux sur l'état de différenciation, elles ne disent rien sur la manière dont s'établit cette différenciation au cours du développement embryonnaire.

SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires consacrés à quelques analyses de différenciation en culture cellulaire :

M. Hubert CONDAMINE, sous-directeur de laboratoire au Collège de France, a donné deux séminaires : l'un sur l'étude *in vitro* des reconnaissances cellulaires spécifiques ; l'autre sur la régulation de la synthèse de la tyrosine-aminotransférase dans les cellules d'hépatome de rat ;

M. Gabriel GACHELIN, chargé de recherche à l'Institut Pasteur, a donné deux séminaires sur la structure des membranes cellulaires ;

M^{me} Hedwig JACOB, maître de recherche au C.N.R.S., a discuté la division cellulaire en relation avec la différenciation ;

M^{me} TIXIER-VIDAL, directeur de recherche au C.N.R.S., a résumé ses travaux sur la différenciation des cellules antéhypophysaires et hypothalamiques en culture ;

M. François CUZIN, maître de recherche au C.N.R.S., a donné un séminaire sur l'infection virale et la différenciation.

M. Charles BABINET, chargé de recherche au C.N.R.S., a donné un séminaire sur l'étude de l'hématopoïèse en culture de cellules ;

M. Thierry BOON, chargé de recherche, a donné un séminaire sur l'étude de l'hématopoïèse en culture de cellules.

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Les recherches sur le développement embryonnaire chez les mammifères, l'étude d'un virus oncogène et l'analyse des systèmes neuronaux se sont poursuivies dans le laboratoire situé à l'Institut Pasteur.

I. - ETUDE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA SOURIS.

Pour les premiers stades du développement embryonnaire chez la souris, nous avons choisi d'utiliser, outre l'embryon de souris, le tératocarcinome du testicule. Cette combinaison permet, en effet, d'étudier les phénomènes de différenciation à la fois sur l'embryon entier et sur des cellules cultivées *in vitro*.

Comme l'a montré L. Stevens à Bar Harbor, les tératomes de la souris, qui contiennent une grande variété de tissus, semblent dus à la prolifération anormale de certaines cellules de la lignée mâle. Ces tumeurs surviennent spontanément avec une forte incidence dans la lignée de souris 129/Sv. Elles peuvent également être expérimentalement provoquées par greffe de la crête génitale d'un embryon ou d'un blastocyste dans le testicule d'une souris 129/Sv adulte. Certaines de ces tumeurs peuvent être transplantées en série dans des souris isogènes par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale. L'étude histologique de ces tumeurs y montre la présence, non seulement de nombreux tissus différenciés, mais aussi de cellules « primitives » auxquelles ont été attribués et le caractère malin des tumeurs et le pouvoir de différenciation.

Après injection d'une tumeur par voie intrapéritonéale dans une souris 129, on trouve dans la cavité péritonéale une ascite contenant de petits corps multicellulaires. Par leur structure, ces derniers ressemblent à des morula ou à des blastula normales, ce qui leur a valu le nom de corps embryoïdes que leur a donné Stevens. Réinjectés dans le péritoine d'une souris, ces corps embryoïdes donnent naissance à des tumeurs contenant non seulement des cellules primitives de tératocarcinome (PTC), mais aussi divers tissus dérivés des trois feuilletts embryonnaires. Placés en culture, ils produisent également des cellules de type différenciés variés. A partir de telles cultures, Gordon Sato d'une part, Boris

Ephrussi d'autre part, sont parvenus à isoler des lignées de cellules primitives. Ces cellules, qui peuvent être maintenues par passages successifs en culture sans se différencier, donnent cependant naissance, après injection à des souris 129/Sv, à des tumeurs où l'on décèle toujours des dérivés des trois feuilletts embryonnaires.

Ces lignées de tératome devraient donc fournir un matériel particulièrement favorable pour l'étude du développement embryonnaire. Non qu'on puisse attendre de trouver, dans les différenciations anarchiques de tératome, un modèle complet pour le développement ordonné d'un embryon. Mais parce que les lignées de tératome devraient fournir un matériel relativement homogène et en quantité suffisante pour aborder certaines études difficilement réalisables sur l'embryon ; par exemple, une analyse biochimique ou immunologique.

C'est donc ce matériel que nous avons choisi d'utiliser en parallèle avec l'embryon de souris. Plusieurs études convergentes sont effectuées par les différents groupes composant l'unité.

A. - *Groupe de culture cellulaire* (P. Avner, T. Boon, J. Gaillard, F. Jacob, H. Jakob, O. Kellermann, J.-F. Nicolas).

A partir de corps embryoides, une série de lignées stables a été isolée, certaines de types « primitives » (PTC), d'autres différenciées (DTC).

Lignées PTC. Quatre lignées nouvelles ont été obtenues : PCC 1, 2, 3 et 4. Dans certaines conditions, ces lignées peuvent se multiplier (depuis plus d'un an) *in vitro* sans se différencier. Injectées à des souris isogènes, elles produisent toutes quatre des tumeurs où l'on trouve, à côté de cellules primitives, des cellules différenciées correspondant aux trois feuilletts embryonnaires. Ces propriétés apparaissent stables. Toutes ces lignées ont, contrairement à la plupart des lignées isolées à partir de souris, un caryotype en apparence euploïde ($n = 20$ chez la souris). On note cependant dans trois d'entre elles la présence de 1 ou 2 chromosomes métacentriques (absents chez la souris normale).

Deux de ces souches sont plus particulièrement étudiées :

— PCC 4 : chez laquelle 20 clones ont été réisolés. 19 de ces 20 clones présentent des propriétés de tumorigénicité et de différenciation en tous points semblables à celles de la lignée d'origine. Plusieurs clones résistants à l'azaguanine (Aza^R) et selon toute vraisemblance déficience en HGPRT ont été isolés. En ce qui concerne la formation de tumeurs et la différenciation, ces clones sont eux aussi semblables à la lignée d'origine.

— PCC 3 : qui dans certaines conditions, et contrairement aux autres lignées, donne lieu à des différenciations *in vitro*.

Cellules DTC. Deux lignées différenciées stables ont été également isolées :

— 1 lignée de myoblaste qui, après repiquage, se multiplie d'abord sous forme de cellules isolées ; après multiplication, on observe une fusion des myoblastes en myotubes qui se contractent sur la boîte de Petri. Cette lignée obtenue à partir d'un corps embryoïde semble posséder des propriétés semblables à la souche de myoblastes obtenue par Yaffé à partir du rat. Elle exprime sa différenciation terminale dans les mêmes conditions.

— 1 lignée de « myocarde » obtenue à partir d'un corps embryoïde différencié *in vitro* en tissu cardiaque. Ces cellules ne battent plus en culture mais contiennent de la myosine de type cardiaque.

En outre, plusieurs lignées cellulaires ont été établies à partir d'embryons de souris 129.

B. - Groupe embryons de souris (C. Babinet, H. Condamine, A. Ryter).

Une recherche de lignées haploïdes de cellules a été entreprise à partir des deux données suivantes : d'un côté, on peut obtenir des tératocarcinomes en greffant un blastocyste 129 dans le testicule d'un animal de la même souche ; d'autre part, on peut obtenir des débuts de développement parthénogénétique chez la souris en envoyant dans l'ovaire la décharge d'un petit condensateur. Des blastocystes parthénogénétiques 129 ont donc été greffés dans des testicules de souris 129. Quelques tumeurs se sont développées et ont été mises en culture. Une lignée stable a pu être obtenue. Toutefois la mesure d'ADN par absorption et en comparaison avec des spermatozoïdes d'une part, des cellules diploïdes de l'autre, a montré que cette lignée était diploïde.

D'autre part, on a cherché à rétablir une différenciation normale chez des cellules de tératome sous l'influence d'embryons normaux. Pour cela la technique des souris allophènes a été utilisée. Des morula provenant de souris normales sont fusionnées avec de petits groupes de cellules de tératocarcinome. Les produits de fusion sont alors réimplantés dans l'utérus de femelle préparée à cet effet. Les souris sont ensuite sacrifiées après des temps variables et leurs voies génitales examinées. Dans un nombre de cas appréciable, des implantations de « blastocystes mixtes » ont été décelées, mais le développement de l'embryon est resté jusqu'ici toujours anormal. Ces expériences sont poursuivies avec des modifications introduites, soit dans la couche de tératocarcinome utilisée, soit dans les conditions de fusion, de culture ou de réimplantation.

G. - Groupe immunologie et membrane (M. H. Buc, D. Dexter, P. Dubois, G. Gachelin).

L'analyse immunologique et biochimique de la différenciation dans ses premiers stades a été jusqu'ici en grande partie empêchée par la difficulté d'obtenir

du matériel en quantité suffisante. Le tératocarcinome pourrait à certains égards combler cette lacune si l'on peut montrer une relation entre certains types cellulaires dérivés du tératocarcinome et des cellules d'embryon normal. Plus particulièrement entre les lignées PTC et les cellules d'embryon précoce puisque ces deux types cellulaires possèdent des « potentialités multiples ».

On s'est efforcé de préciser ce point à partir des deux hypothèses suivantes : 1) les cellules PTC et les cellules d'embryon pourraient posséder des antigènes de surface communs ; 2) il devrait exister des antigènes de surface qui, jouant un rôle important uniquement dans les stades précoces de la différenciation, devraient ensuite disparaître et ne pas être reconnus comme « self » par les souris adultes isogènes.

Pour cela on a injecté à des souris mâles 129 des suspensions de cellules PTC irradiées, selon un horaire d'immunisation précis. Les sérums obtenus se sont montrés actifs contre toutes les cellules PTC. par une série d'épreuves (cytotoxicité, coloration par les anticorps marqués à la peroxydase, absorption). En revanche, les sérums ne sont actifs contre aucun des types cellulaires différenciés essayés (fibroblastes, lymphocytes, thymocytes, myoblaste, myocarde — provenant soit de corps embryoides, soit de souris — série de lignées tumorales) avec deux exceptions : les spermatozoïdes et les cellules de morula. Dans ce dernier cas, on voit progressivement apparaître l'antigène qui, d'abord non décelable dans l'œuf fertilisé, se manifeste en quantité croissante jusqu'au stade 8 cellules.

Ainsi se trouvent vérifiées les hypothèses de départ. Ainsi se trouve également démontrée l'utilité que présente le tératocarcinome pour étudier des propriétés normales de l'embryon qui, faute de matériel, resteraient difficilement accessibles. L'étude biochimique de l'antigène révélé par le sérum anti-PTC est en cours.

D. - *Groupe génétique de souris* (J.-L. Guénet).

Au cours de l'année écoulée s'est poursuivi le développement de l'animalerie « libre de germes pathogènes » Celle-ci, qui maintient 23 lignées consanguines et 60 mutations sous forme de stocks divers, a produit environ 60 000 animaux dans l'année dont 20 000 pour le développement et 40 000 pour les autres services de l'Institut Pasteur.

En parallèle ont été continuées les expériences de mutagenèse de la souris. A partir d'un mâle C 34 traité au thiotepa, 120 gamètes ont été éprouvés par la méthode dite « cross, intercross, backcross ». Dans cette série, 17 translocations autosomales ont été obtenues ainsi que 4 mutations (une semi-dominante et trois récessives) dont les propriétés sont en cours d'analyse. Plusieurs autres expériences de mutagenèse ont été entreprises : une par irradiation cumulée sur plusieurs générations ; l'autre en utilisant des stocks marqués par une série

de mutations récessives liées. Le but de cette dernière expérience est surtout d'obtenir des récessifs létaux avec une technique nouvelle qui permet d'analyser en détail 1/6° environ du génome de la souris.

Ces expériences sont en cours de réalisation. De même qu'une autre expérience visant à déceler des recombinaisons somatiques au cours du développement de la souris.

Enfin, des méthodes d'analyse du caryotype ont été mises au point. Ces techniques (digestion trypsique/giemsas ou dénaturation thermique/giemsas) permettent de repérer à peu près chacun des chromosomes de la souris avec un degré raisonnable de certitude. Sur les deux souches de cellules primitives de tératome analysées jusqu'ici, l'une présente un caryotype que l'on ne peut distinguer de celui de la souris normale ; l'autre possède deux homométacentriques.

II. - *ETUDE D'UN VIRUS ONCOGENE.*

A. - *Spécificité de l'activité endonucléasique associée au virus du polyome* (P. Rouget, A. Parodi, D. Blangy).

Les techniques nécessaires à la localisation du site de coupure par l'enzyme de la molécule d'ADN viral ont été mises au point.

1) L'existence d'un site unique de coupure par génome a été montrée par le fait qu'une molécule dimérique est coupée en deux fragments de longueur égale à un génome, sans qu'apparaissent des produits de taille intermédiaire.

2) La position de ce site est définie par rapport à celui de l'enzyme de restriction bactérien Eco RI : les résultats préliminaires d'expériences de double digestion par les deux enzymes indiquent que le site de coupure pourrait être à 0,08 - 0,12 génome du site RI.

B. - *Purification des protéines néosynthétisées dans une cellule infectée par le polyome* (D. Paulin, J. Perreau, D. Blangy).

Les techniques immuno-chimiques précédemment décrites ont abouti à purifier partiellement 4 peptides principaux, de poids moléculaires échelonnés de 40 000 à 90 000, non détectables dans les extraits de cellules normales (protéines d'information génétique virale, ou protéines cellulaires spécifiquement induites).

La caractérisation de ces peptides (mesure précise des masses moléculaires, cartes des peptides trypsiques, cinétique d'apparition en cycle lytique avec ou sans inhibiteur de la synthèse d'ADN) est en cours, ainsi que la recherche d'activités corrélées avec leur présence (notamment formation de complexes avec l'ADN viral) et la préparation d'anticorps contre ces protéines purifiées.

C. - *Caractérisation d'un antigène précoce* (D. Paulin, C. Ebersolt).

Le sérum d'un mouton immunisé avec des extraits de noyaux de cellules infectées par le polyome permet de détecter un antigène présent uniquement dans des cellules infectées ou transformées par le virus, cytologiquement après couplage des anticorps à la peroxydase, ou par fixation du complément. L'antigène correspondant est en cours d'étude (cinétique d'apparition, relation avec l'antigène T déjà connu pour le virus, étude de mutants ts, purification immuno-chimique et comparaison avec les peptides mentionnés ci-dessus.

III. - *ANALYSE DES SYSTEMES NEURONAUX* (Groupe J.-P. Changeux).

L'essentiel du travail théorique a porté sur une théorie de l'épigenèse des réseaux neuroniques. Cette théorie tient compte de l'existence d'une enveloppe génétique dans le développement des contacts synaptiques. Elle propose que l'état d'activité du réseau est susceptible de modifier la connectivité par stabilisation sélective de synapses labiles. La théorie est appliquée au développement de la jonction nerf-muscle.

La purification et l'étude des propriétés fonctionnelles de la protéine réceptrice de l'acétylcholine des organes électriques de Gymnote ou de Torpille ont été poursuivies. Le fractionnement sur colonne d'affinité permet d'obtenir de l'ordre de la dizaine de mg de protéine réceptrice qui, après une étape supplémentaire de centrifugation, apparaît comme une espèce moléculaire homogène. Sa masse moléculaire est voisine de 215 000 daltons et elle se sépare en deux bandes par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium. En microscopie électronique la molécule de récepteur se présente sous la forme d'une couronne de 90 Å de diamètre avec un puits central hydrophile. La solubilisation de la protéine réceptrice entraîne un accroissement de son affinité pour les agonistes cholinergiques tandis que celle pour les antagonistes ne change pas. Ce phénomène semble révélateur d'une fonction « régulatrice » de la protéine réceptrice.

Injectée à un lapin la protéine réceptrice provoque la formation d'anticorps précipitant anti-récepteur, ce qui entraîne la mort du lapin par paralysie flasque. L'immunsérum bloque la réponse de l'électroplaque à la carbamylcholine ce qui confirme le rôle de la protéine injectée dans l'effet électrogène des agonistes cholinergiques.

Un ligand cholinergique fluorescent développé par Weber et Robertis permet de marquer le site récepteur de l'acétylcholine sur la protéine réceptrice purifiée ainsi que sur des fragments de membrane de Torpille contenant une fraction très élevée de leurs protéines sous la forme de récepteur. L'analyse des

spectres obtenus à partir de ces fragments de membrane révèle que le ligand fluorescent se lie à une autre classe de sites en plus du site récepteur. Au niveau de ce site qui est le site de liaison des anesthésiques locaux, la fluorescence du ligand est sensible au caractère agoniste ou antagoniste de l'effecteur cholinergique fixé sur le site récepteur. Ces études révèlent pour la première fois une transition de structure réversible directement reliée au processus de l'excitation.

Enfin, des études ont été entreprises sur le rôle du récepteur cholinergique dans le développement de la jonction nerf-muscle dans l'embryon de poulet. Le blocage chronique du récepteur par la toxine alpha de *Naja* provoque une atrophie à la fois du muscle et de son innervation. Le développement de la jonction nerf-muscle s'accompagne donc de phénomènes d'épigenèse.

PUBLICATIONS

K. ARTZT, P. DUBOIS, D. BENNETT, H. CONDAMINE, C. BABINET et F. JACOB, *Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture* (*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1973, 70, p. 2988-2992).

D. BLANGY, *Intégration et transcription du génome viral dans les cellules transformées par les virus oncogènes à ADN* (*La Vie médicale au Canada Français*, 1973, 2, p. 349-353).

J.-P. BOURGEOIS, J.-L. POPOT, A. RYTER et J.-P. CHANGEUX, *Consequences of denervation on the distribution of the cholinergic (nicotinic) receptor sites from *Electrophorus electricus* revealed by high resolution autoradiography* (*Brain Research*, 1973, 62, p. 557-563).

J. CARTEAUD, L. BENEDETTI, J.-B. COHEN, J.-C. MEUNIER et J.-P. CHANGEUX, *Presence of a lattice structure in membrane fragments rich in nicotinic receptor protein from the electric organ of *Torpedo marmorata** (*F.E.B.S. Letters*, 1973, 33, p. 109-113).

J.-P. CHANGEUX, Ph. COURREGÉ et A. DANCHIN, *A theory of the epigenesis of neural networks by selective stabilisation of synapses* (*Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 1973, 70, p. 2974-2978).

J.-P. CHANGEUX, J.-C. MEUNIER, R.-W. OLSEN, M. WEBER, J.-P. BOURGEOIS, J.-L. POPOT, J.-B. COHEN, G.-L. HAZELBAUER et H.-A. LESTER, *Studies on the mode of action of cholinergic agonists at the molecular level*, in *Drug receptors*, H.-P. Rand ed. McMillan Press Ltd, Londres, 1973, p. 273-294).

J. COHEN et J.-P. CHANGEUX, *Interaction of a fluorescent ligand with membrane bound cholinergic receptor from Torpedo marmorata* (Biochemistry, 1973, 12, p. 4855-4864).

— *Interaction d'un ligand fluorescent avec la protéine réceptrice de l'acétylcholine présente dans les fragments de membrane de Torpille* (C. R. Acad. Sci. Paris, 1973, 277 D, p. 603-606).

F. CREPEL, F. MARIANI, H. KORN et J.-P. CHANGEUX, *Electrophysiologie du cortex cérébelleux chez la souris mutante « staggerer »* (C. R. Acad. Sci. Paris, 1973, 277 D, p. 2761-2763).

F. CUZIN, P. ROUGET et D. BLANGY, *Endonuclease activity of purified polyoma virions* (in *Possible episomes in eukaryotes*, Proc. 4th Lepetit Colloquium, L. Silvestri ed., North-Holland, 1973, p. 188-201).

G. GIACOBINI, G. FILOGAMO, M. WEBER, P. BOQUET et J.-P. CHANGEUX, *Effects of a snake alpha-neurotoxin on the development of innervated motor muscles in chick embryo* (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1973, 70, p. 1708-1712).

F. HUCHO, J.-P. CHANGEUX, *Molecular weight and quaternary structure of the cholinergic receptor protein extracted by detergents from E. electricus electric tissue* (F.E.B.S. Letters, 1973, 38, p. 11-15).

H. JAKOB, T. BOON, J. GAILLARD, J.-F. NICOLAS et F. JACOB, *Téatocarcinome de la souris : isolement, culture et propriétés de cellules à potentialités multiples* (Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1973, 124 B, p. 269-282).

J.-C. MEUNIER et J.-P. CHANGEUX, *Comparaison between the affinities for reversible cholinergic ligands of a purified and membrane bound state of the acetylcholine receptor protein from Electrophorus* (F.E.B.S. Letters, 1973, 32, p. 143-148).

J.-C. MEUNIER, H. SUGIYAMA, J. CARTAUD, R. SEALOCK et J.-P. CHANGEUX, *Functional properties of the purified cholinergic receptor protein from Electrophorus electricus* (Brain Research, 1973, 62, p. 307-317).

S. MOUSSET et D. BLANGY, *Properties of an SV40 transformed african green monkey kidney BSC-1 cell line interactions between SV40 and cellular DNA metabolism* (Virology, 1973, 52, p. 385-394).

R. OLSEN, J.-C. MEUNIER, M. WEBER et J.-P. CHANGEUX, *Characterization, isolation and purification of the cholinergic receptor protein from Electrophorus electricus organ* (in *Pharmacology and the Future of Man*. Proc. 5th Int. Cong. Pharmacol. San Francisco, 1972. S. Karger Publ., Basel, 1973, 5, 118-129).

H. SUGIYAMA, P. BENDA, J.-C. MEUNIER et J.-P. CHANGEUX, *Immunological characterization of the cholinergic receptor protein from Electrophorus electricus* (F.E.B.S. Letters, 1973, 35, p. 124-128).