

## Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Le cours de cette année a été consacré à l'emploi des mosaïques et chimères dans l'étude du développement embryonnaire de la *Drosophile*. Depuis longtemps, les embryologistes se sont efforcés de repérer les filiations cellulaires au cours du développement. Ils ont notamment utilisé des colorants vitaux qu'ils injectaient dans une cellule et dont ils suivaient la trace dans la descendance de la cellule injectée. Cette méthode n'a que des applications limitées. Aujourd'hui, on cherche à repérer les lignées cellulaires à l'aide de marqueurs génétiques en provoquant la formation de mosaïques et de chimères. Par mosaïque, on désigne un organisme contenant des cellules de génotypes différents formés à partir d'un seul zygote ; par chimère, un organisme de même nature formé à partir de deux ou plusieurs zygotes.

Après avoir rappelé les principales étapes du développement embryonnaire chez la *Drosophile*, on a décrit le système de transplantation mis au point par Hadorn. La plupart des structures de l'adulte sont formées à partir des « disques imaginaux », petits îlots de cellules présents dans la larve. Ces disques imaginaux existent en nombre défini et occupent des positions précises dans la larve. Il en existe un pour chaque œil, un pour chaque patte, un pour chaque aile, etc. Les disques imaginaux restent indifférenciés chez la larve. Ils ne se différencient qu'au moment de la métamorphose sous l'influence de l'ecdysone. Transplanté d'une larve à une autre, un disque imaginal se différencie au moment de la métamorphose de l'hôte et produit, indépendamment de l'endroit où il a été transplanté, les tissus qu'il devait former d'après la place qu'il occupait à l'origine. Ce qu'a montré Hadorn, c'est que, transplantées dans l'abdomen d'un adulte, les cellules des disques imaginaux se multiplient sans se différencier. On peut ainsi les conserver pratiquement à l'infini à l'état indifférencié par transplantation d'adulte sur adulte. Cependant, à n'importe quel moment, la transplantation sur une larve conduit à la différenciation qui, sauf exception, correspond toujours aux tissus auxquels était destiné le disque imaginal d'origine. Il est donc clair que les cellules d'un disque imaginal sont « déterminées » ou « programmées » très tôt.

Les expériences consistant à détruire de petits groupes de cellules sur le blastocyste montrent que, déjà à ce stade, les cellules possèdent un certain degré de différenciation. Pour les stades antérieurs, il faut recourir à des expériences de transplantation nucléaire. Celles-ci consistent à prélever, dans une micropipette, un (ou quelques) noyaux dans le syncytium de segmentation d'un embryon donneur et de le (ou les) réinjecter dans un embryon receveur qui diffère du donneur par certains marqueurs génétiques. Dans les chimères adultes formées à partir des embryons receveurs, on s'efforce de repérer les tissus portant le génotype du donneur. Il s'agit là d'expériences particulièrement délicates chez la *Drosophile*. Mais elles se sont progressivement perfectionnées depuis quelques années. Les résultats indiquent que, pendant la phase de multiplication syncytiale, les noyaux ne sont pas encore déterminés. Comme les cellules du blastocyste semblent l'être, il faut admettre que c'est en arrivant dans un microenvironnement près du cortex, lorsque se forment les cellules, que ces noyaux deviennent déterminés. Les expériences d'Illmensee, qui a transplanté du cytoplasme polaire dans la région antérieure du blastocyste et y a induit la formation de cellules germinales, viennent à l'appui de cette hypothèse.

Après avoir envisagé les marqueurs génétiques qui se prêtent le mieux au repérage des mosaïques, on a discuté les différents procédés permettant de produire des mosaïques à haute fréquence. Il en existe deux principaux :

1) *La recombinaison somatique*, dont la fréquence est accrue par exposition des embryons ou des larves au rayonnement X. Comme l'événement recombinaison semble suivre de très près l'irradiation, il est possible d'induire la recombinaison à une étape choisie du développement embryonnaire. La recombinaison somatique induite fournit donc un excellent instrument pour analyser certains aspects de la différenciation. Elle permet, notamment, d'estimer le nombre de cellules qui, initialement présentes dans un disque imaginal, participent à l'élaboration d'une structure donnée de l'adulte ; d'apprécier la vitesse de multiplication de ces cellules pendant les stades larvaires ; de préciser l'étape du développement où la détermination s'exprime dans la production de structures caractéristiques ; d'analyser l'action des mutants dits « homéotiques » qui modifient la détermination d'un disque imaginal, etc.

2) *Les gynandromorphes* qui sont formés par la perte précoce d'un chromosome X chez un embryon femelle XX. Chez la *Drosophile*, en effet, le phénotype sexuel dépend du rapport entre nombre de chromosomes X et autosomes. Les individus XO ont un phénotype mâle tout en restant stériles, la présence d'un chromosome Y étant nécessaire à certaines étapes de la gamétogenèse. L'embryon femelle XX qui perd un chromosome X pendant les premières étapes du développement donne ainsi naissance à une mosaïque gynandromorphe, certaines régions du corps étant formées de tissus femel-

les XX, les autres de tissus mâles XO. Le choix de marqueurs récessifs convenables sur l'un des chromosomes X permet de distinguer aisément les tissus XX des tissus XO.

Dans une population normale de *Drosophiles*, les gynandromorphes n'apparaissent spontanément qu'à faible fréquence,  $10^{-4}$  environ. Mais on peut accroître cette fréquence de manière considérable en utilisant :

— soit l'un des chromosomes circulaires [In(1)W<sup>vc</sup> ou R(1)5 A] qui possèdent la particularité d'être perdus avec une probabilité très élevée pendant la première ou la deuxième mitose de l'embryon ;

— soit une mère âgée chez qui la fréquence des non-disjonctions est élevée ;

— soit l'une des mutations [*claret* (ca), *perte paternelle* (pal), *perte mitochondrique* (mit)] qui sont connues pour rendre instables certains chromosomes.

Selon la méthode utilisée pour le croisement, 10 à 40 pour cent des embryons femelles donnent naissance à des individus gynandromorphes chez lesquels la perte de l'X ayant été très précoce, la moitié du corps est formée de tissus XO. Mais la frontière entre les deux zones présente une orientation très variable d'un individu mosaïque à un autre. L'explication de ce phénomène est la suivante. On sait depuis 1936 que, après la fécondation, le fuseau de la première division mitotique présente une direction arbitraire. Ensuite se forme une syncytium de noyaux qui apparemment ne se redistribuent pas dans l'embryon mais conservent leurs positions relatives. Les noyaux migrent alors vers la surface où se forment les membranes cellulaires pour produire le blastocyste. Si un chromosome X est perdu pendant la première mitose, les clones XX et XO formés peuplent chacun la moitié du blastoderme. S'il y a peu de mélange entre les noyaux, la frontière entre les deux clones correspond à une ligne fermée à la surface du blastocyste. Comme la position des noyaux sur le blastoderme paraît décider de leur devenir, la structure de la mosaïque chez l'adulte reflète en quelque sorte la relation entre deux clones XX et XO à la surface du blastocyste. Plus deux sites se trouvent éloignés à la surface du blastocyste, plus grande est la probabilité que la frontière orientée au hasard entre tissus XX et XO passe entre eux. Ces probabilités peuvent être aisément mesurées sur une grande série de gynandromorphes. Comme l'a compris Sturtevant dès 1926, elles permettent de construire une « carte du devenir » du blastoderme où sont disposés les sites devant donner naissance à chacun des organes de l'adulte. Ces cartes à deux dimensions, basées sur la fréquence avec laquelle deux structures adultes sont séparées, chez les gynandromorphes, par la frontière entre tissus XX et XO, sont construites un peu comme les cartes génétiques à une dimension basées sur la fréquence avec laquelle deux caractères distincts se réassortissent dans les croisements. Ces cartes du devenir ressemblent à des collages cubistes

où les différents organes de l'adulte seraient disposés sur une surface plane représentant un demi-blastoderme. La méthode des gynandromorphes est maintenant très utilisée pour étudier de nombreux aspects du développement embryonnaire, l'effet de certains mutants létaux, le déterminisme de certains programmes de comportement, etc.

On voit ainsi ce que représente pour l'étude du développement embryonnaire l'extraordinaire outil génétique que constitue la *Drosophile*. C'est toute une méthodologie nouvelle qui s'est ainsi développée depuis une quinzaine d'années. Il reste à voir dans quelle mesure les autres méthodes comme celles de la physiologie, de la biochimie ou de l'immunologie, pourront être appliquées à ce matériel avec un raffinement suffisant pour permettre l'analyse des mécanismes qui sont à la base de la différenciation cellulaire.

#### SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires consacrés aux méthodes génétiques dans l'étude de la différenciation cellulaire.

M<sup>me</sup> Claudie AUDIT, maître-assistant à l'Université de Paris VI, a donné deux séminaires : l'un sur les mutants du développement à effet maternel chez la *Drosophile* ; l'autre sur les mutants zygotiques de développement chez la *Drosophile*.

M. Guy ECHALIER, professeur à l'Université Paris VI, a décrit les cultures *in vitro* de cellules de *Drosophile*.

M. Marko ZALOKAR, directeur de recherche au C.N.R.S., a discuté la formation de mosaïques par injections nucléaires chez la *Drosophile*.

M. Jean-Louis GUENET, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, a exposé les techniques, résultats et enseignements de la mutagenèse chez les mammifères.

M. Hubert CONDAMINE, sous-directeur de Laboratoire au Collège de France, a donné deux séminaires sur les transplantations de matériel nucléaire chez les embryons d'Amphibiens et sur les reconstructions d'embryons chez la souris aux stades *morula* et blastocyste.

M<sup>me</sup> Nicole LE DOUARIN, professeur à l'Université de Nantes, a donné deux séminaires sur les chimères interspécifiques chez l'embryon d'oiseau. Dans le premier, elle a exposé une méthode d'analyse de la migration et de la différenciation des cellules de la crête neurale. Dans le second, elle a discuté l'application à l'étude de l'origine et du renouvellement des lymphocytes du thymus et de la bourse de Fabricius.

## ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Les recherches sur le développement embryonnaire chez les mammifères se sont poursuivies dans le laboratoire situé à l'Institut Pasteur. Ainsi qu'il a été expliqué dans les rapports précédents, cette étude met en jeu deux matériels : le tératocarcinome de la souris et les embryons de souris au premier stade de leur développement. C'est de la permanente confrontation de ces deux matériels que nous espérons pouvoir analyser les premières étapes du développement chez l'embryon de souris. Pour simplifier ce rapport, les résultats obtenus seront exposés sous cinq rubriques correspondant aux différents groupes composant le laboratoire.

### I. - GROUPE DE CULTURE CELLULAIRE

(Philippe Avner, Thierry Boon, Jean Gaillard, François Jacob, Hedwig Jakob, Odile Kellerman, Jean-François Nicolas)

Au cours des années précédentes, ce groupe avait obtenu des lignées stables de cellules en cultures, soit primitives, soit différenciées, à partir de tératocarcinome de souris. C'est essentiellement ce matériel qui a fait l'objet de différentes études.

#### A) *Différenciation in vitro. Etude de la lignée primitive PCC3*

On a tout d'abord cherché à décrire la suite des événements se déroulant dans le temps. Dans une première phase, on a utilisé de simples critères morphologiques et histologiques dans des conditions de culture précises. Les différents stades définis aux jours 0, 10, 12 et 28 doivent servir :

1) à la caractérisation des antigènes de surface (anti-F9, anti- $\theta$ , anti-H-2, anti-PCC4, etc.). Les premiers résultats indiquent que l'antigène F9 est présent à jour 0 mais non H-2 qui apparaît plus tard alors que F9 tend à disparaître. Il n'est pas encore possible de préciser si, aux stades intermédiaires, les deux antigènes peuvent ou non être exprimés simultanément à la surface d'une même cellule ou bien si, à ce stade intermédiaire, on a deux populations cellulaires distinctes ;

2) à obtenir des antisérums contre les cellules des différents stades. Les immunisations contre des cellules de jour 0 et de jour 28 effectuées dans la souris 129 sont terminées ; la caractérisation des antisérums obtenus est en cours.

*Variation des conditions de culture.* En faisant varier les conditions (sources de carbone en cours actuellement), on cherche à modifier les événements de différenciation, soit dans leur séquence temporelle, soit dans les types cellulaires obtenus. Une étude histochimique au niveau des cellules est en cours.

*L'isolement de souches différenciées stables* capables de culture continue est en cours. En un premier temps, on s'efforce d'isoler des cellules morphologiquement différentes des cellules primitives et apparaissant au cours du temps. Ces souches seront utilisées de la même manière que la souche d'origine et seront définies pour leurs antigènes de surface. Une sélection à l'aide de lectines (pouvant avoir des affinités différentes, suivant les types cellulaires) est prévue.

On a également commencé l'étude d'agrégats de cellules PTC pour suivre les événements de différenciation en fonction de la taille, de la position des cellules, etc.

#### B) Recherche de variants à partir de souches primitives de tératocarcinome

a) Dans les cultures de cellules primitives de tératocarcinome, on a cherché à isoler des variants biochimiques chez lesquels pourraient être mises en évidence des modifications dans les capacités de différenciation. On a ainsi pu isoler des clones qui, contrairement aux souches primitives, synthétisent de la glutamine synthétase. Ces clones apparaissent instables au point de vue antigènes de surface. Même après réisolement, on aboutit toujours à des populations mixtes. Certaines cellules possèdent l'antigène F9 à leur surface, d'autres pas. L'étude de ces clones présente un intérêt particulier car certains de ces clones semblent pouvoir repasser d'un état plus avancé de la différenciation à un état moins avancé.

b) Par mutagénèse chimique, on a recherché des clones où seraient modifiées les capacités de différenciation après traitement par l'EMS ou la nitrosoguanidine. Certains clones ont pu être obtenus dont le potentiel de différenciation paraît clairement modifié. Il n'en subsiste pas moins une difficulté majeure : les clones les plus modifiés produisent en général des tumeurs indifférenciées mais parfois des tumeurs faiblement différenciées. On s'efforce d'analyser les raisons de cette instabilité. En outre, ce projet a conduit à un résultat inattendu : des clones obtenus après mutagénisation sont devenus incapables de provoquer des tumeurs malignes dans les souris syngéniques. Toutefois, ces clones restent capables de déclencher des tumeurs chez les souris préalablement irradiées. Ces clones présentent donc un intérêt considérable dans la mesure où ils devraient donner un nouveau moyen d'analyser l'interaction entre les cellules tumorales et les défenses de l'organisme.

C) *Croisements entre lignées PTC diploïdes*

Des clones portant des résistances soit au BudR, soit à l'azaguanine ont été isolés. Des cellules de tels clones ont été fusionnées à l'aide de virus Sendai et les produits sélectionnés par la technique classique du milieu HAT. L'étude des propriétés de ces hybrides (formation des tumeurs, potentiel de différenciation et ploïdie) est en cours.

D) *Isolement de lignées primitives à partir de tératocarcinomes ovariens*

Il y a quelques mois, il a été rapporté par R. Stevens à Bar Harbor que les souris de la souche LT présentaient une haute fréquence de tératomes ovariens spontanés. Certains de ces tératomes ont pu être transplantés à des souris syngéniques. Une telle tumeur nous a été envoyée par le D<sup>r</sup> L. C. Stevens. A partir de la tumeur, des lignées de cellules primitives viennent d'être isolées. Leur étude antigénique et caryotypique est en cours.

## II. - GROUPE IMMUNOLOGIE

(Peter Andrews, Marie-Hélène Buc-Caron, Philippe Dubois, Gabriel Gachelin, Rolf Kemler)

A) *Comparaison des souches de tératocarcinome murin*

Au cours de l'année précédente, un antigène embryonnaire, commun aux cellules PTC et à l'œuf de souris, avait été mis en évidence. Cet antigène avait d'abord été caractérisé sur les cellules de la souche F9, puis de manière plus sommaire sur les autres souches PTC. Dans la mesure où cet antigène semble de quelque façon associé à un produit du gène  $t^{12}$  du locus T, qui contrôle une étape précoce du développement embryonnaire, il était important d'étudier le nombre et la répartition de cet antigène sur les différentes souches PTC. Cette étude a été réalisée par absorptions quantitatives et par cytotoxicité directe.

L'antigène est bien présent sur toutes les souches primitives étudiées (testiculaires ou ovariennes). Cependant, le nombre de sites par cellules ainsi que leur répartition, voire leur mobilité, est extrêmement variable d'une souche à une autre. Il ne semble pas que l'on puisse conclure à l'existence d'une distribution ou d'un nombre caractéristiques tant de l'état primitif que de la capacité à différencier. 80 % de l'antigène est masqué de manière non covalente, mais se trouve cependant sur la surface cellulaire. Ce masquage est aboli de manière identique par traitement des cellules à la neuraminidase ou aux ultra-sons.

On a pu confirmer également l'absence totale d'antigène sur les souches différenciées de tératocarcinome (endoderme, myocarde, myotube). Cette absence n'est pas due à un masquage non covalent d'une structure sous-jacente. Cependant, il est possible que l'antigène t<sup>12</sup> soit masqué de manière covalente par l'acide neuraminique sur l'endoderme.

#### B) *Etude de l'antigène t<sup>12</sup> sur les spermatozoïdes*

L'antigène est également présent sur les spermatozoïdes de souris. Comme il correspond à un gène d'une importance critique pour le développement embryonnaire de la souris, on pouvait tout d'abord se demander s'il ne s'était pas trouvé préservé en tant que mécanisme efficace au cours de l'évolution. On a donc recherché l'existence d'un matériel antigénique de surface présentant une réaction croisée avec l'antigène murin sur les spermatozoïdes de différentes espèces. Cette étude a été menée par cytotoxicité directe, absorption quantitative et immunofluorescence.

Un antigène commun a pu ainsi être mis en évidence chez le porc, le taureau et l'homme, mais non chez le coq. Chez l'homme, une étude plus étendue a permis de lui attribuer une répartition tissulaire analogue à celle du matériel murin, ce qui constitue une forte présomption en faveur d'un rôle voisin et de l'existence d'un analogue du locus T chez l'homme.

Dans une étude ultérieure, on a montré que cet antigène est localisé sur la zone postacrosomique des spermatozoïdes de souris, d'homme et de porc. Une telle localisation est assez intéressante, dans la mesure où il semble que l'ovocyte reconnaisse le spermatozoïde fécondant au niveau de la membrane postacrosomique.

#### C) *Tentatives de purification et d'analyse biochimique de l'antigène*

Afin de pouvoir déterminer la fonction éventuelle de cet antigène et, à tout le moins, de préciser son rôle de marqueur de l'état primitif, il est apparu nécessaire d'une part de purifier cette molécule et, d'autre part, d'analyser la structure du site antigénique. Dans un cas comme dans l'autre, les résultats sont préliminaires et fragmentaires.

— L'antigène comprend une fraction glucidique essentielle à l'activité antigénique : il est en effet détruit par oxydation périodique ménagée, dans des conditions où seuls les résidus galactosyl et sialyl sont oxydés. Par ailleurs, on sait qu'aucun résidu sialyl n'est impliqué dans le site puisqu'un traitement prolongé à la neuraminidase n'altère pas la capacité antigénique. Les résultats sont similaires lorsque l'oxydation est réalisée non plus sur des cellules vivantes, mais sur les fractions solubilisées.



— L'antigène peut être solubilisé par les détergents ioniques et non ioniques au prix cependant d'une labilité accrue et d'une perte partielle d'activité.

#### D) Recherche d'autres marqueurs de la surface cellulaire

*Marqueurs non antigéniques* : les lectines permettent de caractériser des structures de surface indépendamment de leur pouvoir antigénique. En outre, les propriétés tant d'agglutination que de toxicité de ces molécules devraient permettre de les utiliser pour des sélections de souches.

Cinq lectines couvrant les spécificités galactose, glucose, glucosamine galactosamine, « fétuine » et fucose ont été utilisées sur F9 et sur PCC3. Dans tous les cas, les lectines se fixent de manière voisine (10 millions de sites par cellule). Leur pouvoir agglutinant à basse concentration est, par contre, très variable ; en particulier Soybean agglutinin et Concanavalin A agglutinent très peu les deux souches cellulaires. Enfin, une étude différentielle de fixation à 4 °C et 25 °C avec et sans azide de sodium permet de conclure à un turn-over très rapide des sites fixateurs de SBA et Concanavalin A.

*Marqueurs antigéniques*. D'autres marqueurs antigéniques, présents sur les cellules primitives comme sur les formes différenciées, ont été recherchés. En effet le sérum que l'on utilise a été obtenu par immunisation de souris syngéniques avec des cellules F9 ; or ces cellules ont perdu toute capacité à différencier. Des sérums ont été produits contre des lignées totipotentielles. Dans l'état actuel des choses, seul un sérum anti-PCC4 a été analysé, encore que de manière sommaire.

Ce sérum est actif sur PCC4 et toutes les souches PCC ainsi que sur F9. Après absorption massive et répétée sur F9, il reste une activité sur PCC4. Cette activité permet de reconnaître des sites sur PCC1 et PCC3 ainsi que sur les spermatozoïdes et probablement sur la morula. Par contre, ce sérum absorbé est inactif sur les formes différenciées de tératocarcinome. Il s'agit donc là encore d'un antigène embryonnaire précoce dont l'identification est en cours.

#### E) Autres projets

Deux projets sont entrepris en collaboration avec le groupe de Génétique de l'Université de Cornell à New York :

a) Chez une lignée stable de type « endoderme » isolée à partir du tératocarcinome, on a pu mettre en évidence la présence d'un troisième antigène. Celui-ci ne se trouve sur aucune des lignées primitives étudiées. Il apparaît, cependant, chez certains types cellulaires obtenus par différenciation *in vitro*

de PCC3 en culture. Cet antigène est présent sur le spermatozoïde de souris ; il semble également être présent sur les morula au stade 8. On s'efforce maintenant de caractériser les propriétés de cet antigène et sa distribution sur les tissus de l'embryon.

b) On s'efforce d'analyser le contrôle de la synthèse des antigènes du locus T à la surface des spermatozoïdes de souris. Les résultats — d'ailleurs préliminaires — sont compatibles avec un modèle qui suppose que ces antigènes sont synthétisés selon un processus séquentiel où l'expression soit déficiente, soit incorrecte d'un antigène empêche celle des antigènes situés postérieurement dans la séquence.

#### F) *Etude de la mobilité des antigènes t<sup>12</sup> dans la membrane*

L'importance de la mobilité des structures de surface au cours de la différenciation est bien connue. On a donc cherché à préciser la mobilité de l'antigène t<sup>12</sup>.

Cette mobilité mesurée par le nombre de cellules présentant le phénomène de redistribution polaire (capping) est important tant pour F9 que pour PCC4 et PCC3. Dans le dernier cas, le complexe a tendance à s'élever spontanément. Des résultats très similaires sont obtenus sur l'œuf ou sur les blastomères isolés, les anticorps étant aussi redistribués. Les résultats obtenus sur les morula sont plus difficiles à interpréter, mais suggèrent que les cellules externes présentent de la redistribution, tandis que les cellules internes sont relativement immobilisées et rigides.

### III. - GROUPE EMBRYONS DE SOURIS

(Charles Babinet, Hubert Condamine, Françoise Kelly)

#### A) *Distribution de l'antigène F9 chez l'embryon de souris*

Au cours de l'année, on a cherché à préciser le mode d'apparition et l'éventuel disparition de l'antigène F9 chez l'embryon. La méthode d'analyse consistait à utiliser la réaction de la peroxydase couplée à un antisérum anti-immunoglobuline de souris, antisérum qu'on avait fait réagir avec des coupes d'embryons exposés à l'antisérum anti-F9. La révélation de la peroxydase par la benzidine permettait l'examen au microscope électronique des coupes, alors que toutes les observations faites au cours de l'année précédente l'avaient été au microscope optique. Dans ces conditions, les résultats obtenus ont été les suivants :

— La localisation exclusive de l'antigène F9 à la surface des blastomères a pu être confirmée.

— L'apparition de quantités accrues de l'antigène au cours des clivages successifs de l'œuf, et jusqu'au stade morula, déjà observée au microscope optique, a également été confirmée.

— Au stade blastocyste, l'antigène paraît être présent tant sur les cellules trophoblastiques que sur les cellules de la masse interne qui sont les cellules souches de l'embryon.

Si cette dernière observation est exacte, il convient donc d'examiner des stades embryonnaires postérieurs à l'implantation intra-utérine pour préciser le moment où l'antigène disparaît. Dans ce but, l'examen d'embryons prélevés au jour 6 de la gestation a été entrepris et est actuellement poursuivi.

#### B) *Interaction de cellules primitives de tératocarcinome et d'embryons précoces*

Des expériences ont été poursuivies pour préciser si, après intégration dans une morula, des cellules primitives de tératocarcinome peuvent participer à un développement embryonnaire normal. Dans ce but, une masse d'environ 10 à 20 cellules de tératocarcinome était accolée à une morula débarrassée au préalable de la zone pellucide par traitement à la pronase. L'assemblage morula-cellules de tératome était laissé en culture pendant 24 h environ, puis réimplanté dans l'utérus d'une femelle en pseudo-gestation. Les résultats ont été les suivants.

Bien qu'aucune technique de marquage n'ait été disponible qui aurait permis de reconnaître à coup sûr les cellules de tératome parmi les cellules embryonnaires, il semble bien que l'intégration se produise assez fréquemment et n'empêche pas le développement de la morula en blastocyste. En effet, dans une proportion élevée de cas, l'assemblage morula-cellules de tératome fournit, après 24 heures de culture, un embryon très semblable, morphologiquement, à un blastocyste normal, et dans lequel les cellules de tératome n'apparaissent pas groupées en une structure isolée. Qu'un tel embryon fût cependant anormal (à cause, probablement de la présence de cellules tératomateuses) était révélé par la réimplantation dans l'utérus ; par rapport à des blastocystes témoins qui n'avaient jamais été mis en contact avec le tératocarcinome, moins de 10 % des embryons donnaient lieu à un développement poursuivi jusqu'à la naissance d'un souriceau. En outre, tous les souriceaux ainsi obtenus étaient dépourvus de signes qui auraient montré la présence en eux de cellules descendant des cellules tératocarcinomateuses. Ces rares cas sont donc probablement dus à des embryons qui, d'une manière ou d'une autre, se sont débarrassés du composant tératocarcinomateux.

Dans l'état actuel des choses, l'association tératome-embryon paraît donc létale pour ce dernier, au moment de l'implantation, ou juste après. Toutefois, ces expériences mettaient en présence d'une morula une quantité de cellules malignes en général supérieure à celle de la morula. Il paraît intéressant de voir ce qui se passe lorsque, systématiquement, une seule cellule maligne est associée à un embryon. De nouvelles expériences mettant en œuvre des techniques de micromanipulation sont entreprises dans ce but.

#### IV. - GENETIQUE DE LA SOURIS

(Jean-Louis Guénet, Bruno Hurtrel)

##### A) *Mutagenèse chez la souris*

On a réalisé plusieurs expériences destinées à augmenter le taux des mutations chez la souris. Pour cela, différents agents mutagènes physiques (les rayonnements) ou chimiques (Thiotepa) ont été utilisés. Ces expériences ont porté sur 200 gamètes mutagénisés, soit au stade spermatogonie, soit au stade spermatozoïde, et toutes les mutations viables ont été recherchées.

On a ainsi obtenu : 3 translocations réciproques, 1 mutation dominante ( $Ta^{Pas}$ ) et 2 mutations récessives visibles. Ces mutations font, à l'heure actuelle, l'objet d'une étude génétique.

On a également entrepris la recherche et l'isolement de mutations létales récessives à effets précoces. Dans ce but, on a préparé plusieurs stocks de souris portant à l'état homozygote le plus grand nombre possible de marqueurs récessifs indépendants, n'interférant pas entre eux, n'affectant pas la viabilité et reconnaissables dans le très jeune âge. Ces stocks seront utilisés pour repérer par outcross — cross — backcross avec le génotype sauvage, une ségrégation non mendélienne (disparition d'un phénotype par exemple) qui pourrait signifier la présence d'une mutation létale plus ou moins liée aux marqueurs précédemment cités et effectuer un contrôle ultérieur pour lever tous les doutes. Cette expérience est en cours.

##### B) *Transfert de mutants sur 129 Sv*

Une série de croisements en retour de différentes mutations sur des animaux de la lignée 129 ont été entrepris. Cette opération est destinée à établir plusieurs lignées 129 congéniques pour plusieurs allèles létaux récessifs dans le but de les rendre histocompatibles.

C) *Techniques mises au point ou actuellement à l'étude*  
*Congélation à très basse température de l'embryon de souris*

En appliquant la technique mise au point par D. Wittingham, on a réussi à plusieurs reprises la congélation à la température de l'azote liquide et la récupération de morula stade 8 chez la souris. Dans la plupart des cas, les embryons décongelés ont poursuivi normalement leur développement *in vitro* jusqu'au stade blastocyste (cavitation). Cependant (sauf un unique cas), les réimplantations n'ont jamais permis de récupérer des embryons vivants. Cette technique du plus haut intérêt pour nous (conservation de souches) sera reprise courant 1976 avec une intensité accrue.

*Constitution de lignées inbred recombinantes*

On a mis en route deux nouvelles séries de lignées inbred recombinantes :

- l'une entre BALB/C et DBA/2 (CXD2) ;
- l'autre entre C57B1/6<sup>J</sup> et 129 Sv (B6129).

Cette dernière permettra une étude génétique de l'aptitude à la formation de tératomes.

D) *Analyse génétique du comportement*

En liaison avec le laboratoire de M. Cardo à Bordeaux, on a entrepris l'étude génétique des réactions de la souris à l'autostimulation. Le laboratoire de Bordeaux a en effet noté que certaines lignées consanguines de souris présentaient des réponses très différentes aux épreuves d'autostimulation. Les premiers croisements effectués ont montré un comportement homogène des produits F1, semblable à celui de l'un des parents. Les croisements en retour sont maintenant en cours.

V. - *LA SYNAPSE : FONCTIONNEMENT, DETERMINISME  
GENETIQUE ET MODULATION EPIGENETIQUE*

(Groupe J.-P. Changeux)

Des études théoriques ont été consacrées à la mise en place d'un modèle plausible de stabilisation de la synapse embryonnaire par son fonctionnement précoce. Ce modèle relie la libération présynaptique de transmetteur à la protection du récepteur postsynaptique contre une dégradation métabolique et permet le couplage entre les différentes synapses reçues par un même soma neuronique.

Les recherches expérimentales sur la protéine réceptrice de l'acétylcholine des organes électriques de Gymnote et de Torpille ont abouti aux résultats suivants :

1) La détermination des principales propriétés moléculaires de la protéine réceptrice purifiée du Gymnote en solution détergente : structure quaternaire (existence de deux types de chaînes polypeptidiques dont une seule porterait le site récepteur), masse moléculaire (environ 250 000 daltons), interaction avec les détergents (fixation d'au moins 10 % de la masse de la protéine), présence d'un résidu glycosidique démontrée à l'aide de lectines spécifiques, composition en acides aminés semblable à celle d'une protéine cytoplasmique hydrosoluble, constantes de liaison de plusieurs ligands cholinergiques déterminées par équilibre de dialyse.

2) La mise en évidence de propriétés qui dépendent de l'intégration de la protéine réceptrice à son environnement membranaire. Ces études ont été rendues possibles par la mise au point d'une méthode de préparation à partir de l'organe électrique de Torpille, de fragments de membrane synaptique contenant 30 à 40 % de leurs protéines sous forme de récepteur cholinergique. Dans ces fragments, la diffraction des rayons X et la microscopie électronique révèlent une organisation de la protéine réceptrice en réseau hexagonal. La liaison de l'acétylcholine sur ces fragments est coopérative et les anesthésiques locaux, tétracaïne, prilocaïne..., accroissent l'affinité de ce ligand tout en convertissant la forme de la courbe de liaison de sigmoïde en hyperbole. Les ions calcium favorisent la liaison d'acétylcholine mais ne modifient pas sa coopérativité de liaison. Enfin, à l'aide d'un ligand cholinergique fluorescent, le dansylcholine, il a pu être démontré qu'un changement de structure accompagne la liaison de composés agissant comme agonistes sur l'électroplaque de Gymnote. Tous ces effets « régulateurs » disparaissent après solubilisation des fragments de membrane par le cholate ou le Triton X-100. La dispersion par le cholate ou la purification entraînent aussi une diminution de l'affinité intrinsèque de la protéine réceptrice pour les agonistes cholinergiques. La dilution du détergent s'accompagne de la réaggrégation de la protéine qui récupère l'ensemble de ses propriétés régulatrices. Celles-ci semblent donc sous le contrôle de l'environnement membranaire, des lipides en particulier.

3) Si l'élimination du détergent d'un extrait soluble total de membranes riches en récepteur est effectuée de manière ménagée, en présence de concentrations élevées de cations divalents,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ , et de lipides membranaires, des microsacs refermés sur eux-mêmes peuvent être obtenus. L'afflux de  $^{22}\text{Na}^+$  de ces microsacs reconstitués s'accroît en présence de carbamylcholine et cet effet est bloqué par l' $\alpha$  toxine de serpent. La reconstitution du contrôle de la perméabilité aux cations peut donc être obtenue après solubilisation complète de la membrane excitable.

En parallèle avec les recherches sur le récepteur cholinergique, les idées sur le développement synaptique, son déterminisme génétique et sa régulation épigénétique ont été soumises à l'épreuve de l'expérience avec l'embryon de poulet (en collaboration avec le groupe de G. Filogamo de Turin) et avec des mutants cérébelleux de souris.

1) Contrairement à la toxine  $\alpha$  de venin de serpent (*Naja*, *Bungarus...*) la toxine botulinique (de type A) a un effet strictement présynaptique : elle bloque la libération d'acétylcholine. Son injection chronique dans l'embryon de poulet provoque, comme la toxine  $\alpha$ , une atrophie musculaire mais contrairement à celle-ci n'entraîne pas de régression rétrograde des terminaisons nerveuses. Au contraire, un accroissement manifeste du nombre de terminaisons a lieu et des contacts synaptiques s'établissent aussi bien avec des myotubes qu'avec des formes aussi peu différenciées des éléments contractiles que les myoblastes. La toxine botulinique semble donc jouer le même rôle que le signal rétrograde stabilisateur ; peut-être ce dernier est-il porté par les ions calcium.

2) Les protéines de diverses fractions subcellulaires du cervelet de souris ont été suivies par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS. Les deux mutants étudiés sont d'une part le « weaver » qui manque de cellules de grains, d'autre part le « staggerer » chez qui la synapse fibre parallèle-cellule de Purkinje est presque totalement absente. Une protéine nucléaire ( $G_1$ ) de masse moléculaire apparente voisine de 30 000 est réduite chez le « weaver » ; cette protéine est par contre majoritaire dans une préparation de cellules de grains purifiées. Il s'agit vraisemblablement d'une histone.

Une autre protéine (P400) membranaire et de masse moléculaire apparente en SDS très élevée, 400 000, manque chez le « staggerer » ; elle est présente en abondance, par contre, dans une préparation de cellules de Purkinje purifiées.

Deux protéines neuronales ont donc été identifiées ; des études immunologiques sont en cours pour préciser leur rôle.

3) Le contact fibre parallèle-cellule de Purkinje n'évolue pas en synapse mature au cours du développement du cervelet chez le mutant « staggerer ». Cette absence entraîne séquentiellement dans le temps une régression des fibres parallèles puis des somas des cellules des grains, puis de leurs dendrites, enfin, et cela d'une manière transynaptique, des terminaisons des fibres moussues.

L'existence d'une signalisation rétrograde est l'un des postulats de base de la théorie de l'épigénèse des réseaux neuroniques.

PUBLICATIONS

K. ARTZT, D. BENNETT et F. JACOB, *Primitive teratocarcinoma cells express a differentiation antigen specified by a gene at the T-locus in the mouse* (*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1974, 71, p. 811-814).

K. ARTZT et F. JACOB, *Absence of serologically detectable H-2 on primitive teratocarcinoma cells in culture* (*Transplantation*, 1974, 17, p. 633-634).

T. BOON, M. E. BUCKINGHAM, D. L. DEXTER, H. JAKOB et F. JACOB, *Tératocarcinome de la souris : isolement et propriétés de deux lignées de myoblastes* (*Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1974, 125 B, p. 13-28).

M. H. BUC, G. GACHELIN, M. HOFNUNG et F. JACOB, *Presence of a mouse embryonic antigen on human spermatozoa* (*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974, 71, p. 1730-1733).

J.-P. CHANGEUX, *The cholinergic receptor protein : functional properties and its role in the regulation of developing synapses* (In *The cell surface in development*, A. A. Moscona ed., John Wiley and Sons, 1974, p. 207-220).

J.-P. CHANGEUX et A. DANCHIN, *Apprendre par stabilisation sélective de synapses en cours de développement* (In *L'unité de l'homme*, E. Morin et M. Piattelli éd., Centre Royaumont pour une science de l'homme, Le Seuil, 1974, p. 320-357).

J. B. COHEN, M. WEBER et J.-P. CHANGEUX, *Effects of local anesthetics and calcium on the interaction of cholinergic ligands with the nicotinic receptor protein from Torpedo marmorata* (*Mol. Pharmacol.*, 1974, 10, p. 904-932).

— *Effet des anesthésiques locaux sur les propriétés de liaison du récepteur cholinergique de Torpille* (*C. R. Acad. Sci.*, 1974, 278, p. 1269-1272).

D. L. DEXTER, M. H. BUC-CARON, H. JAKOB, J. F. NICOLAS et G. GACHELIN, *Tératocarcinome de la souris : étude des antigènes de la surface de cellules à potentialités multiples* (*Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1974, 125 B, p. 347-356).

Y. DUPONT, J. B. COHEN et J.-P. CHANGEUX, *X-ray diffraction study of membrane fragments rich in acetylcholine receptor protein prepared from the electric organ of Torpedo marmorata* (*FEBS Letters*, 1974, 40, p. 130-134).

R. M. FAUVE, B. HEVIN, H. JAKOB, J. A. GAILLARD et F. JACOB, *Anti-inflammatory effects of murine malignant cells* (*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974, 71, p. 4052-4056).



R. M. FAUVE, H. JAKOB, J. GAILLARD et F. JACOB, *Prolifération et différenciation de cellules primitives de tératocarcinome chez des souris allogènes traitées par une endotoxine* (C. R. Acad. Sci., 1974, 278, p. 1919-1922).

M. FELLOUS, G. GACHELIN, M. H. BUC-CARON, P. DUBOIS et F. JACOB, *Similar location of an early embryonic antigen on mouse and man spermatozoa* (Develop. Biol., 1974, 41, p. 331-337).

J.-L. GUENET, H. JAKOB, J.-F. NICOLAS et F. JACOB, *Tératocarcinome de la souris : étude cytogénétique de cellules à potentialités multiples* (Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1974, 125 A, p. 135-151).

F. JACOB, *Le modèle linguistique en biologie* (Critique, 1974, 322, p. 197-205).

H. JAKOB et F. JACOB, *Production d'immunoglobuline ou de glutamine synthétase par des cellules issues d'un myélome de souris* (Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 1974, 125 C, p. 351-352).

J. MALLET, M. HUCHET, M. SHELANSKI et J.-P. CHANGEUX, *Protein differences associated with the absence of granule cells in the cerebella from the mutant weaver mouse and from X-irradiated rat* (FEBS Letters, 1974, 46, p. 242-246).

J.-C. MEUNIER, R. SEALOCK, R. OLSEN et J.-P. CHANGEUX, *Purification and properties of the cholinergic receptor protein from Electrophorus electric organ* (Europ. J. Biochem., 1974, 45, p. 371-394).

J.-L. POPOT, H. SUGIYAMA et J.-P. CHANGEUX, *Démonstration de la désensibilisation pharmacologique du récepteur de l'acétylcholine in vitro avec des fragments de membrane excitable de Torpille* (C. R. Acad. Sci., 1974, 279, p. 1721-1724).

C. SOTELO et J.-P. CHANGEUX, *Transynaptic degeneration « en cascade » in the cerebellar cortex of staggerer mutant mice* (Brain Research, 1974, 67, p. 519-526).

— *Bergman fibers and granular cell migration in the cerebellum of homozygous weaver mutant mouse* (Brain Research, 1974, 77, p. 484-491).

H. SUGIYAMA, J.-L. POPOT, J. B. COHEN, M. WEBER et J.-P. CHANGEUX, *Binding and functional states of the cholinergic receptor protein from Torpedo marmorata* (In *Protein-Ligand Interactions*, Constance, 1974, H. Sund ed.).

M. WEBER et J.-P. CHANGEUX, *Binding of Naja nigricollis (<sup>3</sup>H)- $\alpha$ -toxin to membrane fragments from Electrophorus electricus and Torpedo electric organs. I. Binding of the tritiated  $\alpha$ -neurotoxin in the absence of effector* (Mol. Pharmacol., 1974, 10, p. 1-14).

— *Binding of Naja nigricollis (<sup>3</sup>H)-α-toxin to membrane fragments from Electrophorus electricus and Torpedo electric organs. II. Effect of the cholinergic agonists and antagonists on the binding of the tritiated α-neurotoxin (Mol. Pharmacol., 1974, 10, p. 15-34).*

— *Binding of Naja nigricollis (<sup>3</sup>H)-α-toxin to membrane fragments from Electrophorus electricus and Torpedo electric organs. III. Effects of local anaesthetics on the binding of the tritiated α-neurotoxin (Mol. Pharmacol., 1974, 10, p. 35-40).*