

Génétique cellulaire

M. François JACOB, membre de l'Institut

(Académie des Sciences), professeur

Le cours de cette année a été consacré à l'emploi des mosaïques et chimères dans l'étude du développement embryonnaire chez la souris. On a tout d'abord rappelé les premières étapes de ce développement. Après la fécondation, l'œuf se segmente et produit une petite boule d'une dizaine de cellules appelée *morula*. Quand le nombre de cellules s'élève à trente environ, apparaît au centre de la boule une cavité qui s'agrandit pour former un *blastocyste*. C'est ce blastocyste qui, cinq jours après la fécondation, vient s'implanter dans la paroi utérine. L'œuf fécondé peut se développer *in vitro* dans un milieu chimiquement défini et atteindre le stade blastocyste. Réimplanté dans une femelle convenablement préparée au point de vue hormonal, un tel blastocyste peut donner naissance à une souris. Cette période de 4 ou 5 jours entre fécondation et implantation, pendant laquelle le développement se poursuit normalement *in vitro*, se prête donc tout particulièrement bien à l'expérimentation.

La formation du blastocyste représente la première différenciation connue. En effet, dans la morula, toutes les cellules paraissent semblables, du moins par les critères actuellement disponibles. Le blastocyste, au contraire, est formé de deux types cellulaires distincts : une mince couche externe, le trophoctoderme, formée d'une trentaine de cellules aplaties et étroitement liées les unes aux autres ; une petite masse plaquée sur la paroi interne du trophoctoderme, la masse interne ou bourgeon embryonnaire, formée de quelques cellules arrondies et facilement séparables les unes des autres. Il s'agit alors de comprendre le mécanisme qui oriente un blastomère, c'est-à-dire une cellule de morula, dans l'une ou l'autre direction.

A partir d'observations histologiques et histochimiques, Dalcq puis Mulnard ont postulé que l'œuf de mammifère, comme celui d'amphibien, avait au départ une polarité et une bilatérité. Ils ont distingué deux régions bien distinctes dans le cytoplasme de l'œuf :

--- une zone dense, dite « dorsale » et considérée comme le « pôle animal »

de l'embryon, zone riche en ARN, en grosses mitochondries et en phosphatase alcaline.

— une zone dite « ventrale », moins dense, d'aspect vacuolaire, riche en mucopolysaccharides et phosphatides, contenant de petites mitochondries.

Selon Dalcq, une ségrégation de ces deux régions se ferait au cours de la segmentation et ce serait la nature du cytoplasme reçu qui déterminerait la différenciation de la cellule : les blastomères recevant du cytoplasme « dorsal » deviendraient des cellules de la masse interne ; ceux recevant du cytoplasme « ventral » formeraient le trophoctoderme en se glissant sur et autour de la masse interne. C'est au stade à 8 blastomères que la ségrégation des cytoplasmes serait achevée et que les cellules deviendraient irréversiblement « déterminées » dans l'une ou l'autre direction.

Cependant, des études plus récentes n'ont pas confirmé l'existence d'une polarité dans l'œuf de mammifère. A ce jour, les analyses chimiques et histo-chimiques n'ont pas démontré la présence, dans le cytoplasme, d'éléments discrets dont la localisation différentielle pourrait être à l'origine de la différenciation cellulaire. En outre, l'hypothèse de Dalcq et de Mulnard s'accorde mal aux résultats de certaines expériences, réalisées notamment par Tarkowski. Celui-ci a montré, en effet, qu'un seul blastomère d'embryon de souris aux stades 2, 4 ou 8 pouvait produire un blastocyste, parfois même capable de s'implanter. Cette implantation, jointe à certaines autres données, a conduit Tarkowski à proposer une autre hypothèse pour rendre compte de la différenciation du blastocyste. Pendant les premiers stades de la segmentation, toutes les cellules ont entre elles des relations à peu près équivalentes, une part de leur surface étant accolée à celle d'autres cellules, une autre part restant libre. Mais à mesure que le nombre des cellules croît et atteint 15 ou 20, certaines cellules occupent l'intérieur de la morula et sont alors complètement séparées du dehors par les cellules externes. Selon l'hypothèse de Tarkowski, ce serait la position, interne ou externe, occupée par une cellule dans la morula qui déterminerait sa différenciation ultérieure. Les cellules externes de la morula formeraient le trophoctoderme du blastocyste, les cellules internes constituant la future masse interne. Depuis que cette hypothèse a été proposée, il y a quelques années, de nombreuses expériences ont été réalisées dans divers laboratoires pour en vérifier le bien-fondé. Ces expériences sont de plusieurs types :

— Marquage des cellules par injection de gouttelettes d'un liquide inerte. A l'aide d'un micromanipulateur, Wilson et ses collaborateurs sont parvenus à injecter des gouttelettes de silicone liquide soit dans des cellules externes, soit dans des cellules internes de morula. Ils ont alors laissé le développement se poursuivre *in vitro* jusqu'au stade blastocyste et repéré au microscope la position des gouttelettes dans le trophoctoderme et la masse interne en fonction du lieu d'injection.

— Fusion d'embryons. Il y a une quinzaine d'années, Tarkowski et Mintz ont montré que deux embryons au stade 8, débarrassés de leurs zones pellucides, s'accolent et produisent *in vitro* un blastocyste d'aspect normal. Réimplantés dans une souris convenablement préparée au point de vue hormonal, ces blastocystes peuvent donner naissance à une souris. Si les deux embryons proviennent de deux lignées génétiques différentes, les souris produites peuvent porter dans leurs tissus des marqueurs génétiques des deux lignées. En d'autres termes, les tissus de ces souris constituent des chimères contenant des cellules de deux génotypes différents. Les souris ainsi formées par fusion de deux embryons sont appelées « allophènes » ou « tetraparentales ». Il est même possible de fusionner plus de deux embryons, jusqu'à une douzaine, qui forment alors un blastocyste géant. On peut donc accoler, autour d'une morula centrale, une douzaine d'autres morula et laisser se former un blastocyste *in vitro*. Si la morula centrale diffère des autres par certains marqueurs enzymatiques relativement faciles à repérer, on peut rechercher son devenir dans le blastocyste.

— Désagrégation suivie de réagrégation de morula. Les blastomères peuvent être assez aisément dissociés à partir d'embryons de stade 4 ou 8. Il est donc possible de réagrégger les blastomères de manière que les cellules internes et externes soient de génotypes différents. Après formation *in vitro* d'un blastocyste, on peut là encore rechercher la distribution de marqueurs enzymatiques en fonction de la position des génotypes dans la morula.

L'ensemble des résultats ainsi obtenus excluent l'hypothèse de Dalcq. Sans toutefois le démontrer pleinement ils s'accordent à l'hypothèse de Tarkowski. Il n'y a actuellement aucun indice sur la nature moléculaire de la différence que peut entraîner pour un blastomère le fait « d'être au dehors » ou « d'être au dedans » de la morula.

On a discuté ensuite l'utilisation des souris allophènes, dans l'étude de certaines questions qui se posent en embryologie : par exemple le nombre de cellules à partir duquel se forme l'embryon proprement dit ; ou le nombre de cellules à partir duquel se forme tel ou tel organe. Ce type d'analyse est basé sur le raisonnement suivant. A partir de deux embryons génétiquement distincts, on obtient des souris dont un organe, par exemple le foie, est constitué de cellules des deux génotypes. Le foie se forme donc à partir d'un nombre de cellules précurseur égal ou supérieur à deux. En faisant l'hypothèse qu'une cellule de chaque génotype a la même probabilité de devenir l'une de ces cellules précurseurs, on peut estimer ce nombre d'après la fraction de souris allogènes où toutes les cellules du foie sont de même génotype. Malheureusement, la solidité de ce raisonnement est fortement diminuée par l'ignorance où nous sommes des nombreux facteurs intervenant dans le développement de l'embryon. Les valeurs ainsi obtenues doivent donc être considérées avec beaucoup de réserve.

Dans un problème au moins, les souris allophènes ont permis d'obtenir une réponse élégante et sans ambiguïté : celui d'une éventuelle fusion cellulaire *in vivo*. On sait, en effet, obtenir maintenant *in vitro* des fusions entre cellules provenant d'organes et d'espèces très variées. On peut donc légitimement se demander dans quelle mesure de telles fusions peuvent aussi survenir *in vivo*. Pour répondre à cette question, B. Mintz a utilisé des souris allophènes produites à partir de deux lignées différentes par la structure d'un certain enzyme. Il existe, en effet, une série d'enzymes — glucose-phosphate isomerase, NADP isocitrate déshydrogénase, malate déshydrogénase — présents dans presque tous les tissus de l'animal, de structure polymérique, et pour lesquels on connaît des mutations de la protéine qui entraînent une modification de la migration électrophorétique. Dans les lignées « inbred », donc homozygotes, ces enzymes se trouvent sous forme d'homopolymère, ce qui se traduit par la présence d'une seule bande, d'un type ou de l'autre, dans les gels d'électrophorèse. Chez les individus hétérozygotes, au contraire, on observe non seulement les deux bandes correspondant à chacun des homopolymères, mais des bandes supplémentaires dues aux hétéropolymères que forment les molécules hybrides. C'est donc la présence de ces bandes hybrides dans les extraits de tissus qui peut signer d'éventuelles fusions entre cellules de génotype différent. Il s'agit là d'une méthode assez sensible car elle permet de déceler jusqu'à un pour cent de la protéine sous forme hybride. Ces molécules hybrides n'ont pu être décelées dans aucun des tissus des souris allophènes à la seule exception, prévisible, des fibres musculaires. Des techniques semblables permettent d'aborder certains problèmes, tels que la structure des follicules pileux, la répartition des mélanocytes, la différenciation sexuelle, les mécanismes de la tolérance immunitaire, l'origine clonale des cancers, etc.

Enfin, on a discuté les mosaïques que forme, chez les femelles de mammifères hétérozygotes pour certains caractères, l'inactivation d'un chromosome X. Pour rendre compte d'une série d'observations, Mary Lyon a proposé en 1961 l'hypothèse suivante : très tôt au cours du développement embryonnaire, l'un de ces deux chromosomes X serait inactivé ; d'une cellule à l'autre, l'inactivation toucherait au hasard soit le chromosome X d'origine paternelle, soit celui d'origine maternelle le chromosome inactivé dans une cellule embryonnaire resterait inactif dans toute la descendance de cette cellule ; l'organisme adulte serait ainsi formé d'une série de clones chez lesquels, tantôt l'un, tantôt l'autre des chromosomes X serait actif. On a tout d'abord précisé les différentes techniques utilisées dans l'étude de ce phénomène : analyse cytologique qui permet de mettre en évidence le corps de Barr dans certains tissus de la femelle adulte de nombreux mammifères, autoradiographique, qui permet de montrer le retard dans la replication d'un chromosome X ; biochimique qui, par la mesure d'activité enzymatique, permet

d'apprécier la dose de gènes fonctionnels ; génétique enfin qui, avec les translocations X-autosomes, offre un matériel exceptionnel pour étudier l'inactivation de certains gènes.

On a alors examiné les arguments expérimentaux qui tentent de répondre à certaines questions telles que : à quel moment de la vie embryonnaire l'inactivation se produit-elle ? L'inactivation a-t-elle lieu au hasard ? L'inactivation touche-t-elle tout le chromosome X ? Est-elle complète ? Est-elle irréversible ? Existe-t-il un centre spécifique d'inactivation ? Pour conclure on a envisagé les différentes hypothèses proposées pour rendre compte d'une masse de données qui s'accroît sans cesse, hypothèses dont aucune n'est encore pleinement satisfaisante.

SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires consacrés à certains aspects génétiques du développement embryonnaire chez la souris.

M. William F. DOVE, professeur à l'Université de Wisconsin, a donné un séminaire sur *Genetic variation in mitotic mammalian cells*.

M. Robert ERICKSON, professeur à l'Université de Californie, a donné un séminaire consacré à *Biochemical genetics of spermatogenesis*.

M. Jacques MARTAL, chargé de recherche à l'I.N.R.A., a discuté les propriétés du *Facteur de signal embryonnaire chez la brebis*.

M. Jean-Louis GUENET, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, a décrit les *Cas d'aneuploïdies et d'aneusomies chez la souris*.

M. André BOUÉ, directeur du Groupe de recherche de Biologie prénatale, INSERM U 73, a discuté les *Echecs de la reproduction dus à des anomalies chromosomiques chez l'homme*.

M. Hubert CONDRAMINE, sous-directeur de laboratoire au Collège de France, a donné deux séminaires sur les *Mutants létaux du développement embryonnaire de la souris*.

M. Charles BABINET, chargé de recherche au C.N.R.S., a donné également un séminaire sur d'autres *Mutants létaux du développement embryonnaire de la souris*.

M. Marc FELLOUS, chef de travaux à l'Hôpital Saint-Louis, a discuté *L'expression du locus Xg chez l'homme*.

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Au cours de l'année écoulée, l'étude de la différenciation cellulaire s'est poursuivie dans le laboratoire situé à l'Institut Pasteur. Ainsi qu'il a été précisé dans les précédents rapports, cette étude met en jeu deux matériels : le tératocarcinome de la souris et les embryons de souris aux stades précoces de leur développement. C'est de la permanente confrontation de ces deux matériels qu'on espère pouvoir analyser les premiers stades du développement embryonnaire chez la souris. Pour la commodité de l'exposé, les résultats obtenus seront décrits sous quatre rubriques correspondant aux différents groupes composant l'unité.

I. - GROUPE DE CULTURE CELLULAIRE

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

a) *Différenciation en culture*

On a décrit précédemment l'isolement d'une souche primitive de tératocarcinome (PCC3) capable de se différencier en dérivés des trois feuillets embryonnaires, non seulement *in vivo* après injection à des souris syngéniques, mais aussi en culture. Cette différenciation *in vitro* se produit de manière reproductible selon un ordre chronologique assez bien défini. Dans les conditions de cultures données, on voit apparaître successivement : du tissu nerveux (du 12° au 15° jour), des cellules musculaires (16° jour), du cartilage (22° jour), des cellules à kératine, des cellules graisseuses et des cellules pigmentées (28° jour).

En prélevant ce matériel différencié du 28° jour et en le remplaçant en culture, on a cherché à obtenir des lignées de cellules différenciées stables en culture. On a ainsi isolé seize lignées de morphologies différentes. Mais alors que, dans l'ensemble de la culture différenciée du 28° jour, les caryotypes observés sont tous normaux (40), les lignées isolées se sont toutes, à l'exception de 2, révélées être aneuploïdes. La majorité de ces lignées ne forment plus de tumeurs, même chez des souris préalablement irradiées. On n'y décèle plus l'antigène embryonnaire F9. Quatre de ces lignées ont été choisies pour une étude plus approfondie, étude qui est maintenant en cours.

Les effets de la source de carbone sur la croissance et la différenciation des cellules PCC3 ont été étudiés. Toute une série de composés — glucose, sucrose, mannose, pyruvate, citrate et malate — permettent une multiplication rapide de ces cellules. En revanche, la différenciation en dérivés des

trois feuillets ne s'effectue normalement qu'en présence de glucose et de mannose. Elle reste incomplète avec le galactose, le sucrose et le pyruvate. Ces derniers substrats n'exercent cependant aucun effet inhibiteur sur la différenciation : présents dans le milieu de culture avec du glucose, ils n'entravent pas la séquence habituelle de différenciation. On a recherché si le glucose devait être présent pendant une période critique pour la différenciation. Les expériences consistent, soit à ajouter à temps variable du glucose dans des cultures qui n'en contiennent pas, soit au contraire à le retirer de cultures qui en contiennent. On constate ainsi que c'est seulement à partir du 11^e jour que le glucose est requis pour la séquence habituelle de différenciation. L'étude histochimique et immunologique des différenciations partielles en l'absence de glucose est en cours.

b) *Lignées de cellules primitives de tératocarcinome ovarien*

Tous les résultats précédents ont été obtenus à partir de tératocarcinomes testiculaires survenant dans la lignée de souris 129. Stevens a récemment décrit des tératomes ovariens survenant dans une autre lignée de souris LT. A partir d'un tératome transplantable, une lignée primitive de tératocarcinome a été isolée. Après injection de ces cellules dans la souris syngénique, on observe la formation de tumeurs qui ne contiennent que peu de cellules différenciées. L'antigène F9 peut être décelé sur 50 % des cellules en culture. Le nombre des chromosomes est de 40 avec, à première vue, deux chromosomes X. Après culture en présence de thymidine tritiée l'autoradiographie montre la présence d'un chromosome à replication tardive, chromosome de morphologie semblable à celle d'un X. L'un des chromosomes X paraît donc inactif, conclusion renforcée par l'isolement relativement aisé de clones résistants à l'azaguanine.

c) *Fusions*

Des essais de fusions, soit entre différentes lignées de cellules primitives, soit entre cellules primitives et cellules différenciées, sont en cours. Sont également en cours des essais de fusion entre noyaux isolés et cellules énucléées provenant les uns de cellules primitives de tératocarcinome, les autres de cellules différenciées. Le but de ces expériences est, bien évidemment, d'étudier d'éventuelles interactions entre composants de cellules en principe peu « programmées » ou au contraire spécifiquement programmées.

d) *Variants obtenus à partir de cellules primitives de tératocarcinome*

A partir d'une lignée de cellules primitives, une série de variants a été isolée de la manière suivante. Des cellules PCC4 ont été exposées à la nitrosoguanidine. A partir des cellules survivantes (0,1 à 1 % de la popula-

tion initiale), plusieurs clones ont été isolés. Environ 20 % de ces clones sont incapables de produire des tumeurs par injection à la souris syngénique 129. Ces variants sont désignés sous le nom de « tum⁻ ». Une dizaine de tels clones sont maintenant en cours d'étude.

En culture, les variants « tum⁻ » ne sont pas soumis à l'inhibition de contact. A priori, leur incapacité à produire des tumeurs dans l'animal syngénique peut donc être expliquée de deux façons : ou bien ces cellules sont incapables de se multiplier dans le milieu métabolique et hormonal de la souris ou bien elles sont activement rejetées par l'animal. Pour résoudre cette alternative, on a injecté ces variants dans des souris préalablement irradiées à 60 rads. Les dix variants « tum⁻ » essayés sont tous capables de former des tumeurs dans les souris irradiées et, à l'exception d'un seul, leurs tumeurs croissent aussi rapidement que celles provoquées par l'injection de PCC4 aza 1. Plus récemment, on a constaté que les variants « 20 » et « 25 » produisent des tumeurs dans les souris « nude ». Cela suggère que les lymphocytes T participent au rejet.

En association avec le groupe de J.-P. Lévy et J.-C. Leclerc, à l'hôpital Cochin, on a tenté de mettre en évidence *in vitro* un effet lytique de lymphocytes immuns sur ces divers variants « tum⁻ ». Aucun effet n'a été obtenu malgré de nombreux essais. On a pu montrer que, comme les cellules parentales PCC4 aza 1, les variants « tum⁻ » « 20 » et « 43 » ne portent pas ou extrêmement peu de l'antigène P-30, spécifique des oncornavirus murins.

On a pu démontrer clairement que les variants « tum⁻ » sont rejetés par un mécanisme de rejet immunologique classique car on peut mettre en évidence une « mémoire » de rejet : on immunise des souris avec des cellules de variants « 20 » ou « 25 » ; trois semaines plus tard, on irradie ces souris à 300 rads pour leur injecter ensuite les mêmes cellules et ces souris ne développent pas de tumeurs. Il faut donc admettre qu'il y a des cellules-mémoire qui ont survécu à l'irradiation. De plus, si on irradie des souris à 600 rads et si on les « reconstitue » par injection intraveineuse de splénocytes de souris immunisées avec des cellules « 20 » ou « 25 », ces souris sont capables de rejeter des cellules homologues injectées peu après.

II. - GROUPE IMMUNOLOGIE

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

a) *Préparation et caractérisation d'antisérum*

Etude du sérum anti-PCC4

On a poursuivi l'étude des propriétés d'un antisérum produit dans la souris 129 contre les cellules de la lignée multipotentielle PCC4. Le sérum reconnaît plusieurs antigènes différents. L'un est l'antigène F9 précédemment décrit. Après absorption sur F9, une activité cytotoxique résiduelle persiste sur PCC4. Cette activité n'est absorbée que par les autres souches PCC et par la souche de tératocarcinome ovarien LT1, ainsi que par les spermatozoïdes. Une étude en immunofluorescence révèle qu'en plus de ces anticorps cytotoxiques se trouvent des anticorps réagissant sur des cellules de type endodermique; cette activité est absorbée par la souche Pys-2. L'antigène PCC4 défini après absorption sur F9 et Pys-2, et qui correspond à l'activité cytotoxique définie plus haut, n'est exprimée ni sur leur morula ni sur les blastocystes entiers. Son expression chez l'embryon reste inconnue.

Etude du sérum anti-F9

Une étude complémentaire du sérum anti-F9 a révélé que, d'une part il contenait une activité non cytotoxique absorbable par les cellules Pys-2, et d'autre part qu'il correspondait probablement à deux spécificités distinctes. En effet, l'absorption de sérum anti-F9 par des spermatozoïdes de la souche C3H laisse environ 40 % d'activité résiduelle sur F9 tandis que les spermatozoïdes 129 et C57/B1/6 en enlèvent la totalité.

Etude de sérums anti-Pys

En complément de l'étude réalisée sur des cellules d'endoderme embryonnaire, on a essayé d'obtenir des antisérums dirigés contre des cellules de sac vitellin (Pys). Deux antisérums ont été préparés. Le sérum préparé sur la souris syngénique reconnaît exclusivement un déterminant présent sur F9 et sur Pys, absent du spermatozoïde. Un sérum préparé sur des souris non syngéniques (A/Or anti-Pys) reconnaît deux antigènes distincts. L'un correspond au précédent; l'autre, étudié après absorption de l'antisérum sur les cellules F9, semble être l'antigène Endo, présent sur le spermatozoïde. L'existence d'un troisième composant n'est pas exclue.

Etude d'un sérum anti-t¹²

On a préparé dans la souris C57/B1/6 un sérum dirigé contre des spermatozoïdes de la souche BTBr porteuse des mutations T/t¹². Après absorptions sur cellules testiculaires T/+, +/+, sur lymphocytes BTBr T/t¹², ce

sérum est actif exclusivement sur les spermatozoïdes t¹² sur lesquels, en immunofluorescence, il colore la zone postacrosomique. Il est inactif sur des spermatozoïdes T/+ et +/+.

Autres antisérums

La production d'antisérums syngéniques dirigés contre des lignées cellulaires issues soit de la différenciation *in vitro* de PCC3, soit d'embryons mis en culture ou transformés par le virus SV40 se poursuit. Il en est de même de l'exploration systématique de ces mêmes souches par des antisérums de spécificité connue. Aucun résultat concluant n'a encore été obtenu.

b) Expression des antigènes F9 et H-2 au cours de la spermatogenèse

Les spermatozoïdes sont les seules parmi les cellules de la souris adulte à porter l'antigène F9. On a donc recherché quand il apparaît sur les cellules de la lignée germinale mâle. En fait, on le trouve par immunofluorescence et par absorption à partir des gonocytes et, de là, sur toute la lignée germinale aussi bien chez la souris que chez l'homme. On a également recherché la présence de l'antigène d'histocompatibilité H-2 au cours de la spermatogenèse. Par absorption sur des préparations cellulaires fractionnées ou prises à des âges précis au cours du développement *post partum*, on a pu montrer que les antigènes 1a apparaissent sur les spermatocytes 1 au cours de la phase leptotène, puis que leur quantité allait croissant jusqu'au spermatozoïde. Il en est de même pour les antigènes H-2 décelés à l'aide de sérums monospécifiques non contaminés par des anti-1a. Il semble donc que, dans cette lignée, l'expression des antigènes adultes soit concomitante de la première différenciation irréversible.

c) Expression de la β 2-microglobuline

Dans un travail réalisé en collaboration avec les Universités américaines du Texas et Cornell, il a été montré que l'antigène F9 a une structure très voisine de celle des antigènes H-2. En particulier, il comporte un composant de poids moléculaire 12.000 qui pourrait être une β -2 microglobuline. Utilisant un sérum anti- β 2-microglobuline de souris fourni par Tanigaki, on a montré que la β 2-microglobuline de type adulte n'est pas exprimée sur les cellules de tératocarcinome primitif et que, par conséquent, la molécule de poids moléculaire 12.000 correspond à un autre type de structure, peut-être une β 2-microglobuline embryonnaire. Par ailleurs, l'expression de la β 2-microglobuline décelée par le sérum de Tanigaki est associée, au moins dans la série tératome, à l'expression des antigènes H-2. La possibilité d'une asso-

ciation de F9 à cette molécule adulte sur les spermatoocytes 1 où les deux antigènes coexistent est en cours d'étude.

d) *Etude de marqueurs de surface non antigéniques*

L'interaction de 5 lectines de spécificité différente avec des cellules de deux types de tératocarcinome (F9 et PCC4) et de cellules du sac vitellin (Pys) a été étudiée. Il semble que l'on puisse considérer comme marqueurs différentiels de cette différenciation la disparition totale des résidus fucosyls terminaux et l'augmentation considérable des résidus N-acetyl-D-galactosamine terminaux, tels que ces changements sont décelés par la « Fucose Binding protein » et la « Wax bean agglutinine ».

III. - GROUPE EMBRYONS DE SOURIS

(Charles Babinet, Hubert Condamine, Françoise Kelly)

a) *Identification de l'antigène F9 au produit de l'allèle sauvage du gène t^{32}*

On sait, par des expériences d'absorption, que l'antigène F9 a quelque relation avec le locus T. Tout se passe en effet comme si les spermatozoïdes porteurs de la mutation t^{w32} (mutation du locus T qui bloque, à l'état homozygote, le passage de la morula au stade blastocyste) étaient incapables d'absorber l'activité d'un antiserum anti-F9, alors que les spermatozoïdes « sauvages » épuisent cette activité. Une interprétation de cette observation est que le groupe de complémentation défini par la mutation t^{w32} constitue le gène de structure qui dirige la synthèse de l'antigène F9. Cette interprétation a été mise à l'épreuve dans les expériences suivantes :

1°) On a d'abord tenté de vérifier que les *morula* homozygotes pour la mutation t^{w32} sont bien dépourvues de l'antigène F9. Des femelles hétérozygotes $+/t^{w32}$, obtenues par croisement de femelles NCS ($+/+$) avec des mâles BT.BR (T/t^{w32}), ont été accouplées avec des mâles BT.BR (T/t^{w32}). Le haut degré de transmission des spermatozoïdes porteurs de l'allèle t^{w32} entraîne que, dans un tel croisement, 40 à 45 % des embryons sont homozygotes t^{w32}/t^{w32} . La recherche par immunofluorescence de l'antigène F9 a été effectuée soit au 3° jour, soit au 4° jour après la fécondation. Dans le premier cas les embryons sont au stade *morula* ; dans le second cas, la moitié des embryons a atteint le stade blastocyste, le reste est toujours au stade *morula* et on peut présumer que la plupart de ces *morula* sont en fait des embryons homozygotes pour la mutation t^{w32} , arrêtés dans leur développement. L'expérience montre que, au 3° comme au 4° jour, près de 40 % des embryons ne sont pas colorables en immunofluorescence par l'antisérum

anti-F9 et cela dans des conditions où, pour l'essentiel, la totalité des embryons provenant d'un croisement qui ne produit pas d'homozygotes t^{w32}/t^{w32} est colorée. En outre, quand l'expérience est effectuée au jour 4, les embryons non colorés sont toujours des morula, jamais des blastocystes. L'ensemble de ces données autorise donc à conclure que l'antigène F9 est bien absent de la surface des morula homozygote t^{w32}/t^{w32} (R. Kemler, H. Condamine et Ch. Babinet).

2°) Réciproquement, on a tenté de mettre en évidence, à la surface d'embryons homo- ou hétérozygotes, un antigène de la mutation t^{w32} . Pour cela un antiserum a été préparé en immunisant des mâles $+/+$ contre les spermatozoïde de mâles hétérozygotes T/t^{w32} . Après une série d'absorptions convenables, un antiserum spécifique a été obtenu qui colore, en immunofluorescence, à la dilution 1/30, 50 % des spermatozoïdes de l'hétérozygote $+/t^{w32}$ et aucun spermatozoïde du sauvage ($+/+$). Appliqué à la dilution 1/20 sur des *morula* d'un croisement ♂ T/t^{w32} x ♀ $+/t^{w32}$, ce sérum colore environ 70 % des embryons. Dans les mêmes conditions, il ne colore aucun embryon issu d'un croisement ♂ $+/+$ x ♀ $+/+$. On a donc révélé un antigène dont la présence paraît spécifiquement liée à la mutation t^{w32} . Ce résultat, s'il est définitivement confirmé, est important. Les antigènes liés au locus T avaient, jusqu'à présent, été mis en évidence à la surface des seuls spermatozoïdes. Leur présence à la surface des cellules embryonnaires était postulée, non démontrée. Ce serait ici le premier exemple d'une telle démonstration. D'autre part, envisagées comme un tout, les expériences 1 et 2 donnent beaucoup de poids à l'interprétation selon laquelle l'antigène F9 et l'antigène t^{w32} sont les produits de deux allèles d'un même gène.

b) *Présence de l'antigène F9 chez les mammifères*

Des expériences antérieures avaient montré que l'antigène F9, d'abord mis en évidence chez la souris, pouvait être retrouvé sur du matériel humain, les spermatozoïdes notamment. Ces recherches ont été étendues à d'autres espèces et l'antigène F9 a pu être décelé, toujours par immunofluorescence, à l'aide d'un sérum antitératocarcinome de souris sur les embryons précoces (*morula*) de toutes les espèces de mammifères où il a été recherché : le rat, le lapin, le porc, le bœuf. Ceci confirme qu'au cours de l'évolution un mécanisme a dû jouer pour conserver, à travers des espèces éloignées, un même antigène sous une forme relativement peu modifiée. Ces expériences ont été effectuées en collaboration avec des membres du groupe de M. C. Thibault à l'I.N.R.A.

c) *Expression de l'antigène F9 au cours de l'embryogenèse*

Des expériences antérieures avaient montré que l'antigène F9 apparaît progressivement au cours des premiers stades de la segmentation de l'œuf.

Par immunofluorescence on le décèle toujours à la surface du blastocyste. La question posée est celle du devenir de l'antigène au cours des stades ultérieurs de l'embryogenèse. Des essais ont été effectués pour mettre en évidence l'antigène sur des cellules d'embryons aux 6^e et 7^e jours du développement. Pour cela, les décidua étaient disséquées, fixées sous l'action du glutaraldéhyde et sectionnées au cryostat. Les coupes contenant le matériel embryonnaire proprement dit étaient collées sur lame de verre et traitées par un immunosérum. Ces essais ont donné des résultats négatifs et il n'a pas été possible de révéler la présence de l'antigène F9 dans ces conditions. Une autre technique a alors été utilisée. Des embryons ont été prélevés au 9^e jour de leur développement, séparés par dissection de leurs membranes (trophoblaste et sac vitellin) et dissociés par pipetage répété. On a ensuite examiné si la suspension de cellules embryonnaires ainsi obtenue pouvait absorber l'activité d'un antisérum anti-F9. Les absorptions étaient réalisées dans des volumes très faibles (25 μ l) en raison du petit nombre de cellules embryonnaires couramment utilisées (quelques dizaines de milliers). Les résultats ont été les suivants :

— au 9^e jour du développement, les cellules d'embryons de souris 129/Sv absorbent l'activité d'un sérum anti-F9 avec une efficacité comparable à celle des cellules de la souche de tératocarcinome F9.

— au 10^e jour du développement, les cellules embryonnaires n'absorbent pas ou très peu cette même activité. L'aptitude à absorber l'activité de sérum anti-H2 a été examinée parallèlement. Au 9^e jour, aucune absorption n'est décelée, alors que les cellules du 10^e jour déplacent de façon significative la courbe de titration du sérum anti-H2. Il semble donc que l'antigène F9 persiste jusqu'au 9^e jour de la vie embryonnaire et disparaisse ensuite de la majorité des tissus de l'embryon. En outre cette disparition paraît contemporaine de l'apparition de l'antigène H-2 et ceci rejoint des résultats obtenus antérieurement sur des cellules tératocarcinomeuses en voie de différenciation *in vitro*. Toutefois la technique utilisée ne donne aucun renseignement sur la localisation de l'antigène F9 dans un embryon du 9^e jour. Il serait donc important de trouver des conditions qui permettent de révéler l'antigène sur coupes et cette question demeure à l'étude.

d) *Etude de la différenciation du blastocyste*

Une théorie assez couramment admise par les embryologistes prévoit qu'à partir du moment où une cellule de morula devient interne, c'est-à-dire est complètement entourée par d'autres cellules, elle est vouée à participer à la constitution de la masse cellulaire interne du blastocyste. Cette théorie repose sur des expériences de reconstruction de *morula* à partir de blastomères isolés et marqués, soit génétiquement, soit par incorporation de substances radioactives. On a essayé de mettre au point une technique de marquage qui

permette d'observer directement la position des blastomères marqués (ou de leurs descendants) dans le blastocyste issu *in vitro* d'une morula recomposée. Pour cela des blastomères isolés étaient obtenus à partir d'embryons au stade 4 cellules et incubés pendant une nuit en présence de particules de latex liées à une substance fluorescente. Au bout de ce temps, les blastomères avaient ingéré suffisamment de particules pour être intensément colorés en fluorescence. Des *morula* étaient reconstituées en plaçant un blastomère marqué au centre d'une couronne de blastomères fraîchement isolés par dissociation d'embryons au stade 8-cellules. L'addition d'une lectine au milieu favorisait la cohésion des blastomères entre eux. Placées en culture, les *morula* ainsi obtenues se développent en des blastocystes qu'on peut examiner en fluorescence. La position du matériel fluorescent indique l'emplacement des descendants de la cellule interne. Des blastocystes ont été obtenus où la fluorescence était localisée exclusivement dans la masse cellulaire interne. Toutefois le nombre de blastocystes obtenu a été trop faible pour décrire avec précision le devenir de la cellule interne dans ces conditions.

e) Recherche de tératomes portant des mutations T

Des expériences sont en cours en vue d'obtenir des lignées de tératocarcinome porteuses de mutation au locus T. Un stock de souris a été fabriqué, hétérozygote, pour la mutation t^{w18} (qui empêche, à l'état homozygote, la différenciation normale du mésoderme) et pour une translocation (Rb7) qui transforme en métacentrique le chromosome 17 porteur du locus T. Il est donc possible de dire si un embryon (ou une lignée cellulaire en dérivant),

provenant d'un croisement $\frac{+ t^{w18}}{Rb7 +} \times \frac{+ t^{w18}}{Rb7 +}$ porte la mutation t^{w18}

à l'état homo- ou hétérozygote et cela au moyen d'un simple caryotype. Des blastocystes provenant d'un tel croisement sont implantés sous la capsule testiculaire de mâles de génotype approprié. Les mâles sont sacrifiés au bout d'un mois, les testicules disséqués. Plusieurs tumeurs ont été d'ores et déjà obtenues à partir de blastocystes réimplantés. Elles sont toutes hétérozygotes pour la mutation t^{w18} et on s'efforce d'isoler à partir d'elles des lignées permanentes.

IV. - GROUPE GENETIQUE DE LA SOURIS (Jean-Louis Guénet)

a) Recherche de mutations létales récessives

Trois stocks porteurs de nombreux marqueurs récessifs ont été construits. A partir de ces stocks, les expériences ont été conduites selon le schéma sui-

vant. Des mâles portant ces mutations sont exposés à des mutagènes, puis croisés avec des femelles sauvages. Des mâles F¹ issus de ce croisement sont ensuite croisés avec d'autres femelles sauvages. Les filles F₂ sont alors croisées en retour avec leur père. On recherche, dans la descendance, l'absence de certains marqueurs récessifs, cette absence indiquant la présence voisine d'une mutation létale. Deux mutations létales précoces, obtenues à partir de 30 gamètes, ont été isolées et sont en cours d'étude.

b) Recherche et isolement de nouvelles mutations

Au cours de l'année ont été isolés :

— une translocation réciproque sur la lignée 129 Sv, translocation désignée T18 Pas ;

— trois mutations dominantes ou semi-dominantes :

- *Tabby (Ta)* sur génotype 129 Sv,
- une mutation pleiotrope (*W^t*) affectant la couleur, la lignée germinale et le système hématopoïétique,
- *M11*, mutation nouvelle affectant le squelette ;

— une mutation récessive, *shudderer (shu)* dont le phénotype rappelle celui de la démyélinisation.

c) Localisation et étude de mutations

Trois mutations sont en cours d'étude :

- *Eh (Hairy ears)* isolée par Russell à Oak Ridge. C'est une mutation létale au 5^e jour. Elle est située sur le chromosome 15 entre *bt* et *Ve*,
- *Er (Repeated epilation)* isolée par Russell à Oak Ridge. C'est un léthal tardif. Il n'y a formation ni de stomodeum, ni d'exocoelome, ni des membres,
- *min (minuscule)* isolée à l'Institut Pasteur.

d) Lignées recombinantes inbred

On sait l'importance prise par ces lignées pour analyser n'importe quel caractère différenciant deux lignées inbred. Deux séries de recombinants ont été établies :

1°) 129 x C57/B1/6 (ou 129 x B6). 17 clones, actuellement F6 ou F7, sont en cours d'élevage. Ils permettront notamment d'analyser l'origine génétique : des tératomes ; des antigènes de transplantation présents à la surface des lignées de tératocarcinome primitif ; de l'hypersensibilité de type retardé (en collaboration avec le laboratoire de la tuberculine) ;

2°) BALB/c x DBA/2 (ou C x D2). 11 clones actuellement F5 ou F6 sont en cours d'élevage. Ils permettront d'analyser notamment le déterminisme génétique du comportement d'autostimulation (en collaboration avec le laboratoire de Psychologie expérimentale de la Faculté de Bordeaux) et de la réaction GVH (Graft versus host).

PUBLICATIONS

C. BABINET, H. CONDAMINE, M. FELLOUS, G. GACHELIN, R. KEMLER et F. JACOB, *Expression of a cell surface antigen common to primitive mouse teratocarcinoma cells and cleavage embryos during embryogenesis and spermatogenesis* (In *Teratomas and Differentiation*, Academic Press, 1975, p. 101-107).

T. BOON, O. KELLERMANN, E. MATHY et J.A. GAILLARD, *Mutagenized clones of a pluripotent teratoma cell line : variants with decreased differentiation of tumour-formation ability*, (In *Teratomas and Differentiation*, Academic Press, 1975, p. 161-166).

P. CAZALA, J.L. GUENET et B. CARDO, *Genetic analysis of self-stimulation behavior in mice* (*Brain Res.*, 1975. Supplementum. Abstract of papae presented to the 7th Annual Meeting of the European Brain and Behavior Society, München, 8-10.9.1975, p. 11).

G. GACHELIN et M. FELLOUS, *Tératocarcinomes murins, locus T et lignée germinale* (*Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 1975, t. 15, p. 685-691).

F JACOB, *Mouse teratocarcinoma as a tool for the study of the mouse embryo* (In *The early development of Mammals* (British Society for Developmental Biology Symposium 2), Balls & Wild ed, Cambridge University Press, Cambridge, 1975, p. 233-241).

J.F. NICOLAS, P. DUBOIS, H. JAKOB, J. GAILLARD et F. JACOB, *Tératocarcinome de la souris : différenciation en culture d'une lignée de cellules primitives à potentialités multiples* (*Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1975, 126 A, p. 3-22).

E.S. VITETTA, K. ARTZT, D. BENNETT, E.A. BOYSE et F. JACOB, *Structural similarities between a product of the T/t locus isolated from sperm and teratoma cells, and H-2 antigens isolated from splenocytes* (*Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 1975, t. 72, p. 3215-3219).