

## Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Cette année, le cours a été consacré à l'étude du complexe dit T/t chez la souris. On a tout d'abord rappelé certains aspects généraux du développement embryonnaire. Le corps d'un organisme adulte tel qu'un mammifère est formé de plusieurs milliards de cellules qui dérivent toutes d'une même cellule initiale : l'œuf fécondé. Les différents processus impliqués dans le développement de l'embryon — la croissance, la production de formes et la différenciation des organes — ont donc tous une base cellulaire. Pendant l'embryogenèse, les cellules, tout en se multipliant, se développent dans des directions divergentes et en arrivent à différer fortement entre elles. Mais les quelques milliards de cellules formant l'adulte peuvent être classées en quelque 150 à 200 types de base : cellules musculaires, nerveuses, cartilagineuses, conjonctives, etc. Il est cependant bien établi aujourd'hui que toutes ces cellules, si différentes soient-elles par leur morphologie, leur chimie et leur fonction, contiennent exactement le même jeu de gènes, ceux que l'œuf au moment de la fécondation a reçu pour moitié du père et pour moitié de la mère. Il faut donc admettre que les différences entre cellules correspondent à des différences, non pas de constitution génétique, mais de fonctionnement des gènes. Le gène qui détermine la structure de l'hémoglobine, par exemple, est présent dans toutes les cellules du corps mais il ne s'exprime par la production d'hémoglobine que dans la lignée cellulaire conduisant aux globules rouges. Dans les autres types cellulaires, ce gène reste silencieux. A chaque étape du développement, une cellule donnée peut donc être définie par son *état* résultant d'une expression différentielle des gènes. En termes moléculaires, cet état est caractérisé par les macromolécules autres que l'A.D.N., en particulier les protéines, dont la présence ou l'absence dans la cellule est réglée par la mise en route, ou la mise au repos, de tel ou tel ensemble de gènes.

On peut alors se représenter la différenciation cellulaire comme due à une série de changements dans l'état des cellules au long de voies bien précises. Chaque cellule (même l'œuf fécondé, même les cellules de l'embryon

précoce ou blastomères) correspond à un état particulier de différenciation d'où elle peut passer à un autre en réponse à quelque signal.

Cependant, une cellule ne semble pas pouvoir sauter d'un état donné à n'importe quel autre. Un blastomère, par exemple, ne se transforme pas en neurone d'un seul coup. Pour chaque état, le choix vers d'autres états possibles semble très limité, peut-être même réduit à une seule alternative. Une fois prise, la décision imposerait alors une nouvelle alternative ouverte pour le choix suivant. A chaque étape du développement, le comportement d'une cellule paraît ainsi être guidé par son *histoire* embryologique. Il doit également être lié à l'environnement de la cellule car la différenciation cellulaire est inséparable de la croissance, de la morphogenèse, de la formation des tissus. L'état d'une cellule ne peut donc être indépendant de celui de ses voisines. Il est nécessairement lié à la *position* de la cellule dans l'organisme.

Pour qu'un changement d'état puisse être lié à la position de la cellule, il doit s'effectuer en réponse à un signal chimique spécifiant cette position d'une manière ou d'une autre. Si l'on considère les tout premiers stades du développement embryonnaire dans le monde animal, il semble que la différenciation puisse utiliser deux types de signaux différents : chez les embryons *déterminés*, le signal semble être présent dans l'œuf avant même la fécondation. Chez les embryons à *régulation*, l'apparition du signal est liée au développement même de l'embryon. L'embryon de *Drosophile* est un exemple du premier type. Après la fécondation, le noyau se multiplie sans que l'œuf se divise. L'œuf devient ainsi un syncytium contenant environ 1 000 noyaux qui, pour autant qu'on sache, sont tous équivalents. Puis ces noyaux migrent vers la périphérie de l'œuf. Alors seulement, une cellule se forme autour de chaque noyau par synthèse de membranes. Et le sort de chaque cellule — destinée à constituer la tête, ou une aile ou une patte, etc. — semble désormais fixé. Il semble donc que, au départ, l'œuf possède un cytoplasme hétérogène. Les cellules qui résultent de la segmentation de l'œuf diffèrent entre elles par le fragment de cytoplasme qu'elles se trouvent recevoir. Et ces fragments de cytoplasme doivent contenir des espèces moléculaires différentes qui agissent sur le noyau.

Chez les mammifères, les choses se passent de manière différente. Après fécondation, l'œuf se divise en 2, puis en 4 cellules, etc., donnant naissance au 3<sup>e</sup> jour à une structure compacte d'environ 20 cellules, ressemblant à une mûre et appelée pour cela *morula*. Au 4<sup>e</sup> jour, une cavité apparaît dans la morula qui se transforme alors en *blastocyste*. Alors que dans la morula, toutes les cellules ont une morphologie semblable, le blastocyste est composé de 2 types cellulaires bien distincts : une couche de cellules externes, plates formant le trophoblaste ; une petite boule de cellules appelée masse interne. Ces deux types cellulaires diffèrent, non seulement par leur aspect,

mais par certaines propriétés biochimiques et par leur devenir : le trophoblaste formera la partie embryonnaire du placenta après implantation du blastocyste dans l'utérus maternel ; la masse interne au contraire donnera les tissus de l'embryon proprement dit et certaines annexes. La transformation de la morula en blastocyste avec ses deux types cellulaires représente la première différenciation cellulaire décelable. La seconde a lieu au sein de la masse interne. Au 4<sup>e</sup> jour, toutes les cellules y semblent identiques. Au 5<sup>e</sup> jour, on y reconnaît deux types distincts : à la surface, vers la cavité, une couche de cellules endodermiques ; dessous, des cellules ectodermiques. Là encore ces deux types cellulaires diffèrent, tant par certaines propriétés chimiques que par leur devenir.

Quelle est donc la nature des signaux qui déclenchent successivement ces deux différenciations ? On sait que jusqu'au stade 8 cellules, chacun des blastomères reste capable de donner les deux types de cellules caractérisant le blastocyste. Ces blastomères paraissent donc être identiques. La différenciation ultérieure de la morula ne peut donc provenir d'une hétérogénéité initiale de l'œuf dont différentes molécules seraient inégalement distribuées lors des divisions. Le signal paraît venir d'une situation créée par les divisions successives de l'œuf fécondé. Après la première division, en effet, les deux cellules filles diffèrent de la cellule mère par le fait que la surface de chacune est en partie en contact avec la surface de l'autre. Si cette relation vient à se rompre et si les deux cellules sont séparées, chacune d'elle devient semblable à la cellule mère et peut être à l'origine d'un organisme entier. A mesure que se poursuivent les divisions, certaines cellules se trouvent complètement enfermées au sein de la morula tandis que d'autres sont placées à la périphérie. Les cellules internes diffèrent alors des cellules externes par le fait que seules ces dernières ont une partie de leur membrane libre de tout contact avec d'autres cellules. Il y a quelques années, Tarkowski en Pologne a suggéré que la première différenciation observée dans le blastocyste était liée à la position des blastomères dans la morula : les cellules externes de la morula deviendraient le trophoblaste et les cellules internes de la morula formeraient la masse cellulaire interne du blastocyste. Des expériences ingénieuses réalisées par les embryologistes d'Oxford sont en accord avec cette hypothèse. Ce groupe a montré également qu'un mécanisme semblable sous-tend la seconde différenciation, qui, dans la masse cellulaire interne, donne naissance à l'endoderme primitif et à l'ectoderme : les cellules externes situées le long de la cavité ou blastocèle, donnent l'endoderme primitif, tandis que les cellules internes, situées plus en profondeur, vont former l'ectoderme. Ainsi lors des deux premiers choix offerts aux cellules, la décision paraît dépendre de la position des cellules au dedans ou au dehors. Dans les deux cas, les signaux semblent provenir de quelque interaction des cellules. Le problème devient alors de comprendre

ce que signifie, en termes moléculaires, « être au dehors » ou « être au dedans ».

On voit l'intérêt que présentent ces deux premières étapes du développement où, à partir d'une cellule qui commence à se multiplier, se posent deux coup sur coup deux choix conduisant à des types cellulaires distincts. Les questions évoquées précédemment — relation entre position et différenciation, nature du signal, changements chimiques accompagnant ou précédant la différenciation — s'y trouvent clairement posées. En outre, après la fécondation, les œufs prélevés au stade 1 chez la souris peuvent être mis en culture dans un milieu très simple. Ils s'y développent en 4 jours jusqu'au stade blastocyste, ce qui permet de nombreuses manipulations. La qualité de ces blastocystes peut elle-même être éprouvée par réinjection dans les cornes utérines de femelles convenablement préparées au point de vue hormonal : ils s'implantent dans l'utérus et poursuivent le développement jusqu'à la naissance.

Le complexe T/t de la souris correspond à une région du chromosome 17 située entre le centromère et la région H-2 gouvernant les antigènes majeurs d'histocompatibilité. Ce complexe consiste en deux séries de facteurs dominants (T) et récessifs (t). L'expression de ces facteurs est très complexe, mais à l'état homozygote, la plupart d'entre eux bloquent le développement de l'embryon à des étapes bien précises. On voit donc l'intérêt de ce système pour analyser certains des mécanismes, intervenant dans le développement de l'embryon.

1) *Facteurs dominants T*. Le premier mutant de la série T a été décrit en 1927 sous le nom de « brachyoure » par Dobrovolskaia-Zavadskaia à l'Institut Pierre Curie de Paris. Il s'agissait d'une souris à queue courte qui, dans les croisements avec des souris de type sauvage, transmettait ce caractère à la moitié de sa descendance. L'analyse génétique a montré que ce phénotype « queue courte » était sous la dépendance d'un seul gène dominant. Elle a montré également que l'allèle T se comportait aussi comme un récessif létal, les embryons homozygotes T/T mourant aux environs du 10<sup>e</sup> jour de la vie embryonnaire.

Depuis lors une vingtaine de facteurs T ont été décrits qui sont apparus, soit spontanément dans des élevages de souris, soit après traitement par des agents mutagènes. Il semble bien qu'il s'agisse de mutations plus ou moins complexes dans la région T/t du chromosome 17.

2) *Facteurs récessifs t*. Les premiers facteurs t ont été décrits par Dobrovolskaia-Zavadskaia et Kobozieff en 1932. En croisant leurs souris brachyours (T/+) avec des souris sauvages capturées aux environs de Paris, ces auteurs ont observé, dans la descendance, la présence de souris sans

queue. L'analyse génétique a montré la présence d'un facteur récessif, appelé « anoure » et plus tard  $t$ , présentant les propriétés suivantes :

- les souris hétérozygotes ( $+/t$ ) sont normales,
- les souris doublement hétérozygotes  $T/t$  sont sans queue,
- les souris homozygotes  $t/t$  ne sont pas viables.

Les facteurs  $t$  ne peuvent donc être aisément repérés chez les hétérozygotes  $+/t$  qui sont normaux. On les décèle en les croisant avec des animaux  $T/+$  par la présence de descendants sans queue. Ce système a été repris et étudié en détail par L. C. Dunn et ses élèves, notamment S. Gluecksohn-Waelsch et D. Bennett.

Un grand nombre de facteurs récessifs  $t$  ont maintenant été isolés. Leurs propriétés ont été étudiées en détail. Elles peuvent être résumées de la manière suivante :

*Groupes de complémentation.* Les haplotypes  $t$  peuvent être conservés sous la forme de croisements dits « balancés » du type  $T/t^x \times T/t^x$ . Comme les animaux homozygotes  $T/T$  et  $T^x/t^x$  ne sont pas viables, seuls les animaux hétérozygotes  $T/t^x$  qui n'ont pas de queue sont produits dans de tels croisements.

Si l'on croise des hétérozygotes portant chacun un haplotype  $t$  différent  $T/t^x \times T/t^y$ , on obtient des résultats différents selon les paires d'haplotypes  $t^x$  et  $t^y$  en cause. Avec certaines paires, on n'obtient pas d'animaux avec queue normale et on en conclut que les hétérozygotes  $t^x/t^y$  sont non viables. Avec d'autres paires, on obtient des animaux avec queue, dont on peut montrer qu'ils correspondent aux hétérozygotes  $t^x/t^y$ . On considère que dans le dernier cas les deux haplotypes  $t^x$  et  $t^y$  se complètent mais non dans le premier cas. En effectuant de tels croisements par paires avec les haplotypes  $t$  connus, on peut ranger ces haplotypes en 6 groupes de complémentation tels que deux haplotypes  $t^x$  et  $t^y$  font partie d'un même groupe de complémentation si l'hétérozygote  $t^x/t^y$  est non viable. Ils font au contraire partie de deux groupes différents si l'hétérozygote  $t^x/t^y$  est viable. De fait la viabilité de ces hétérozygotes n'est jamais de 100 %. Le nombre des descendants avec queue ne représente que de 10 à 80 % de ce que l'on attend.

*Effet létal sur les embryons homozygotes.* Pour chaque groupe de complémentation, les embryons homozygotes paraissent bloqués à un stade précis du développement, différent d'un groupe à l'autre. Par exemple le groupe  $t^{12}$  est bloqué au stade morula et ne peut produire de blastocyste ; le groupe  $t^{w73}$  forme un blastocyste qui ne s'implante pas ou mal ; le groupe  $t^o$  ne forme pas l'endoderme primitif ; le groupe  $t^{w5}$  ne forme pas d'ovocylindre, etc.

*Anomalies dans la transmission des haplotypes t par les mâles hétérozygotes.* Dans les croisements ♀ +/t × ♂ +/+, 50 % des descendants sont de génotypes +/t et 50 % de type +/+ comme on attend. En revanche dans les croisements inverses ♀ +/+ × ♂ +/t, ce rapport 1 : 1 n'est le plus souvent pas retrouvé. Selon les haplotypes t la proportion des hétérozygotes varie de 0,25 à 99,9 %. Ce résultat semble dû à une stabilité différente des deux types de spermatozoïdes dans les voies génitales de la femelle.

*Stérilité des mâles.* Les mâles hétérozygotes pour deux haplotypes t sont stériles. La spermatogénèse a bien lieu et le nombre des spermatozoïdes produits est normal ; mais ces spermatozoïdes présentent de nombreuses anomalies morphologiques et semblent incapables d'atteindre le site normal de la fécondation.

*Suppression de la recombinaison.* La plupart des haplotypes t suppriment la formation de recombinants sur un segment important du chromosome 17, s'étendant du centromère à une région située au delà du locus H-2.

*Origine des haplotypes t.* La plupart des haplotypes t connus ont été obtenus dans des souris sauvages capturées dans la nature. De fait il semble que près de 20 % des souris prélevées n'importe où sur le globe contiennent un haplotype t. Cette fréquence d'haplotypes récessifs létaux, mais transmis souvent à très haute fréquence par les mâles, soulève un problème de génétique des populations particulièrement intéressant.

*Recombinaison génétique à l'intérieur du complexe T/t.* Au cours des croisements balancés de type T/t<sup>x</sup> × T/t<sup>x</sup>, on obtient rarement, mais de manière reproductible (10<sup>-3</sup> à 2.10<sup>-3</sup>), des animaux exceptionnels, par exemple des animaux à queue normale, dont on peut montrer qu'ils proviennent de recombinaisons à l'intérieur du complexe t. En étudiant une série d'exceptions de ce genre, Mary Lyon a pu montrer l'existence, dans la région T/t, d'au moins 3 à 4 facteurs différents, gouvernant respectivement : l'interaction avec le facteur dominant T et l'effet sur la queue ; les anomalies de la spermatogénèse ; l'inhibition de la recombinaison génétique ; l'effet léthal chez les embryons homozygotes.

On mesure ainsi la complexité que présentent les haplotypes t. Cette région du chromosome 17 joue un rôle de première importance dans de nombreux aspects de la morphologie et de la différenciation cellulaire. Il semble probable que l'étude de cette région connaîtra des développements variés dans les années à venir.

F. J.

SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires sur certains aspects du développement embryonnaire.

M. Jean-Louis GUENET, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, a donné deux séminaires sur les mutations létales du développement embryonnaire et sur les aneusomies de la souris.

M. Hubert CONDAMINE, sous-directeur au Collège de France, a décrit deux cas de stérilité d'hybrides chez la souris.

M. Laurent DEGOS, chef de clinique à l'Hôpital Saint-Louis, a donné un séminaire sur « HL-A et maladies ».

M<sup>me</sup> Christiane CREPIN, attachée de recherche au C.N.R.S., a fait un exposé sur les analogies entre l'embryon précoce de souris et les corps embryoides formés *in vitro* à partir de cellules de tératocarcinome.

M. Jacques BALLET, chargé de recherche à l'I.N.S.E.R.M., a présenté une revue sur « Déficits immunitaires chez l'homme ».

M<sup>lle</sup> Berthe SALZGEBER, maître de recherche au C.N.R.S., a exposé les résultats d'études sur la genèse des malformations des membres chez l'embryon de poulet.

M. Marc FELLOUS, chef de travaux à l'Hôpital Saint-Louis, a discuté la question : « Y a-t-il un analogue du locus T de la souris chez l'homme ? »

M. Joshua FEINGOLD, maître de recherche à l'I.N.S.E.R.M., a donné un séminaire sur la génétique et l'épidémiologie du *Spina bifida* et de l'anencéphalie.

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

L'étude de la différenciation cellulaire s'est poursuivie au cours de l'année écoulée 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 en comparant sans cesse ces deux matériels qu'on espère pouvoir analyser les premiers stades du développement embryonnaire chez la souris. De manière un peu artificielle, mais pour la commodité de l'exposé, les résultats obtenus seront décrits sous quatre rubriques correspondant aux différents groupes composant l'unité. Toutefois la plupart des sujets de recherche sont étudiés par des membres appartenant à des groupes différents et apportant des techniques différentes.

## I. - GROUPE DE CULTURE CELLULAIRE

(Harvey Eisen, Jean Gaillard, François Jacob, Hedwig Jakob, Françoise Kelly, Simone Lacaille, Jean-François Nicolas, Steven Pfeiffer).

On a poursuivi l'étude des événements qui se produisent au cours de la différenciation *in vitro* des cellules de carcinome embryonnaire. En outre, on a cherché à influencer les phénomènes de différenciation *in vitro* de différentes manières.

### A) Etude des événements

*qui se produisent au cours de la différenciation in vitro*

L'étude des lignées « différenciées » issues *in vitro* de carcinome embryonnaire (CE) PCC3A/1 et plus particulièrement d'une lignée à caractéristiques de mésenchyme a été poursuivie. Les cellules de cette lignée, injectées à la souris, donnent naissance à la formation d'un os et cette caractéristique a été étudiée avec plus de détails.

La présence et l'organisation de la tubuline et de l'actine dans les cellules EC ainsi que dans les types cellulaires « différenciés » qui en dérivent a été étudiée. Il en ressort que la tubuline est présente dans toutes les cellules, quel que soit leur état de différenciation et que pour l'actine, l'organisation de celle-ci change de façon spectaculaire avec l'état de la cellule, l'organisation en câbles étant caractéristique de types cellulaires « différenciés ».

Il est clair aussi qu'en dehors des changements membranaires étudiés par ailleurs, les communications entre cellules doivent jouer un grand rôle. Ce problème a été abordé par le biais des phénomènes de coopération métabolique. Pour cela des mutants HGPRT<sup>-</sup> (Azaguanine résistants) de nombreuses lignées CE et différenciées ont été isolés. La coopération cellulaire entre les cellules sauvages et mutantes est mise en évidence par le sauvetage de ces dernières dans le milieu HAT dans lequel les cellules HGPRT négatives ne peuvent survivre seules. Un système d'étude quantitatif a été mis au point. Par cette technique, on a pu mettre en évidence que :

1) Au cours de la différenciation, les cellules de type CE semblent s'isoler métaboliquement des autres cellules.

2) Les cellules CE coopèrent entre elles avec une efficacité supérieure à celle observée entre cellules CE et divers types de cellules différenciées.

3) Les affinités de différentes cellules CE entre elles sont très différentes.

Ces constatations permettent de supposer l'existence de types de coopération soit qualitatifs, soit quantitatifs, différents de ceux existant chez les



cellules différenciées. Elles permettent aussi de classer les cellules de types CE en différents groupes.

B) *Influence de différentes substances sur les phénomènes de différenciation*

Nous avons étudié l'action de fragments monovalents Fab d'immunoglobulines de lapin dirigés contre la cellule F9, sur la différenciation *in vitro* de cellules PCC3 A/1. Ces fragments, en cours d'étude dans ce système, sont capables d'inhiber l'apparition de la différenciation. Il est intéressant de noter que les phénomènes de coopération métabolique sont abolis par les fragments Fab. Il est donc possible que le blocage de la différenciation soit dû à une inhibition de la communication entre les cellules.

On a étudié l'action de l'hexaméthylène bisacétamide (HMBA) — connue comme inducteur de la différenciation *in vitro* des cellules de Friend — sur un grand nombre de lignées CE nulli- et pluripotentes ainsi que sur des cellules différenciées. A la concentration de 5mM, l'HMBA provoque rapidement des changements morphologiques, biochimiques et immunologiques des cellules de CE mais non des cellules différenciées. Les cellules CE s'aplatissent, l'actine s'organise en câbles, la phosphatase-alcaline disparaît, l'activateur du plasminogène apparaît, l'antigène F9 n'est plus décelé, sans que pour autant les antigènes H-2 apparaissent. Avec certaines lignées, ces différents changements sont très rapides et s'effectuent dans l'ensemble des cellules. Avec d'autres lignées, au contraire, une fraction des cellules conserve par exemple encore l'antigène F9, sans que ces cellules deviennent résistantes par la suite à l'action de l'HMBA. Ces caractéristiques peuvent éventuellement servir à classer les différentes lignées CE.

Une nouvelle lignée CE (PCC7-S), isolée d'un tératocarcinome spontané d'une souris de lignée recombinante-inbred C57/129 a également été étudiée au cours de la différenciation *in vitro*. Cette lignée pluripotente donne naissance surtout à des cellules de type nerveux. La caractérisation de ces cellules a été effectuée par la mise en évidence de certains marqueurs enzymatiques.

En outre, on a pu montrer que cette lignée CE est parfaitement euploïde et possède un chromosome Y. Celui-ci est présent dans toutes les cellules même après maintien en culture pendant des temps assez longs (3 mois). On a montré :

- 1) que l'antigène F9 est présent sur les cellules CE, alors que l'antigène H-Y n'y est pas décelable,
- 2) au cours de la différenciation *in vitro* l'antigène F9 disparaît mais H-Y devient exprimé.

### C) *Hybrides cellulaires*

Une série d'hybrides entre cellules CE et cellules différenciées, telles que lymphomes, cellules de Friend ou musculaires ont été obtenus. Les caractéristiques caryologiques, isozymiques et immunologiques de ces hybrides ont été étudiées. Quelques rares hybrides sont stables en culture à long terme, en particulier des hybrides obtenus avec la cellule de Friend. Il sont en cours d'étude.

### D) *Susceptibilité au virus du polyome et à SV40 dans le tératocarcinome de la souris*

1) Les cellules de carcinome embryonnaire PCC3/A/1 ne peuvent être infectées par le virus du polyome ou par SV40 lorsqu'elles sont maintenues à l'état non différencié ; elles deviennent susceptibles aux deux virus au cours de la différenciation *in vitro* et cette apparition de la susceptibilité semble suivre celle de l'antigène H-2. Au cours de la différenciation induite par HMBA, on a observé également une augmentation progressive de la susceptibilité à l'infection virale qui est du même ordre de grandeur pour les deux virus. Ainsi, lorsque les cellules sont infectées 2, 5 et 12 jours après le début du traitement par HMBA par le virus du polyome, le nombre de cellules positives pour la présence de l'antigène V, 48 heures après infection, est respectivement de 1 %, 5 % et 50 %.

Au cours de la différenciation induite par HMBA, l'antigène F9 disparaît, mais l'antigène H-2 n'apparaît pas contrairement à ce que l'on observe dans la différenciation spontanée. L'apparition de la susceptibilité à l'infection virale n'est donc pas nécessairement liée à celle de H-2.

2) Par des expériences de fusion entre des cellules CE infectées par le virus du polyome et des cellules différenciées, on a montré que le virus pénétrait dans la cellule, donc que le blocage de l'infection virale survenait après la pénétration du virus et avant la synthèse de l'antigène précoce T. Ces résultats indiquent aussi que la susceptibilité est dominante, suggérant que des facteurs cellulaires nécessaires à l'expression virale sont absents des cellules de carcinome embryonnaire.

On a vérifié que l'expression d'un génome viral intégré dans le génome cellulaire est également possible, en fusionnant des cellules CE avec des cellules transformées par SV40 : la majorité des hétérocaryons expriment l'antigène T de SV40.

3) On peut supposer que les cellules de carcinome embryonnaire pourraient manquer de certains facteurs cellulaires nécessaires à l'expression des virus SV40 et polyome, peut-être au niveau de la recombinaison entre génomes viraux et cellulaires. On a donc comparé les échanges de chromatides

sœurs (ECS) — qui traduisent des événements de recombinaison et/ou de réparation — dans les cellules CE et dans des cellules différenciées. Les résultats indiquent que, chez les cellules CE, contrairement aux cellules différenciées, la mitomycine n'induit guère de ECS. Ce résultat est compatible avec un défaut dans les mécanismes de réparation. Cependant d'autres interprétations sont possibles et diverses expériences témoins sont nécessaires.

E) *Etablissement de lignées cellulaires par transformation avec le virus SV40*

A partir de cellules de la lignée CE PCC3/A/1 traitées par HMBA — à la concentration de 5 mM pendant 5 jours — puis infectées par SV40, on a obtenu deux lignées cellulaires. En l'absence d'infection virale, les cellules ainsi traitées par HMBA arrêtent de se multiplier assez rapidement et il n'a pas été possible jusqu'à présent d'obtenir de lignées établies. Après infection, on peut, par contre, obtenir des clones avec une fréquence de 1,5 sur  $10^5$  cellules. L'une de ces lignées a une morphologie de type endodermique, l'autre ressemble à la majorité des cellules PCC3/A/1 après traitement par HMBA. Comme ces cellules, les deux lignées sont caractérisées par l'absence des antigènes F9 et H-2. Elles semblent également présenter un nouvel antigène de surface — correspondant peut-être à l'expression d'un virus endogène — et que l'on cherche à préciser.

F) *Etude de la différenciation hématopoïétique dans les cellules de Friend*

1) *Mobilité des protéines membranaires dans les globules rouges de mammifères*

a) La plupart des cellules de mammifères possèdent des membranes dont la bicouche lipidique est plus ou moins fluide. Cela se manifeste par la mobilité latérale des composants dans le plan de la membrane. Lorsqu'on lie les protéines de surface cellulaire avec des réactifs polyvalents, on voit d'abord l'aggrégation de celles-ci en mosaïque (« patch »). Cette réaction n'exige pas d'énergie et reflète l'état de fluidité de la membrane. L'aggrégation des protéines de surface en mosaïque conduit, dans la plupart des cellules, à la formation de calotte polaire (cap), les mosaïques étant transférées vers l'uropode de la cellule puis absorbées à l'intérieur. La formation d'une calotte exige de l'énergie et ne se produit pas à basse température. A l'heure actuelle, on pense que le transport des mosaïques est effectué par le cytosquelette de la cellule, mais le mécanisme moléculaire de ce processus n'est pas connu. Il existe néanmoins des types cellulaires qui ne donnent pas de mosaïques lorsque leurs protéines de surface sont liées par des réactifs polyvalents. Le globule rouge de mammifère en est un exemple. Cela reflète un manque de mobilité parmi les composants de la membrane chez les globules rouges. On a étudié ce manque de mobilité des

protéines de membrane chez les globules rouges en étudiant le rôle de l'environnement lipidique et celui des protéines transmembranaires elles-mêmes.

On s'est demandé si les protéines transmembranaires des globules rouges deviennent mobiles lorsqu'elles sont insérées dans la membrane d'une cellule capable de produire mosaïque et calotte polaire. On a donc fusionné les globules rouges humains avec des globules rouges ou des lymphocytes B de souris (à l'aide du virus Sendai ou de polyéthylène glycol). Après fusion, on a repéré les protéines provenant de chaque type cellulaire à l'aide d'anticorps spécifiques marqués avec des résidus fluorescents (soit la rhodamine, soit la fluoresceine). Lorsque des globules rouges provenant des deux espèces ont été fusionnés, on a employé des anticorps spécifiques pour la glycophorine de chaque espèce et marqués avec des chromophores différents. Lorsque les globules rouges humains ont été fusionnés avec des lymphocytes de souris, les anticorps employés ont été l'antiglycophorine d'homme et l'anti-immunoglobuline de souris.

b) Lorsque les globules rouges des deux espèces sont fusionnés à 37 °C, il y a une redistribution des deux types de protéine qui est achevée en 40-60 minutes. Cela conduit à une distribution uniforme des deux antigènes sur la surface des cellules fusionnées. Pourtant on ne voit pas de redistribution des deux espèces de spectrine, la protéine majeure de la face interne de la membrane des globules rouges. C'est la spectrine qui est considérée comme responsable du manque de mobilité des protéines de surface chez les érythrocytes.

c) Chez les produits de fusion entre hématies humaines et lymphocytes de souris, l'addition d'anti-glycophorine entraîne la formation de mosaïques et de calottes par cet antigène. Si un anti-glycophorine et un anti-immunoglobuline de souris sont ajoutés aux produits de fusion, on provoque la formation de calottes par ces deux antigènes, mais les deux calottes sont séparées. L'antigène du globule rouge se redistribue plus rapidement.

Ces résultats montrent que les protéines des membranes des globules sont capables de se redistribuer lorsqu'on modifie leur environnement. Cela suggère que le manque de mobilité des protéines dans la membrane des globules rouges est dû à la composition en lipides de la membrane.

## 2) *Erythropoïèse*

Les études sur la régulation de la différenciation érythroïde provoquée chez les cellules érythroleucémiques de Friend (cellules FL) ont été poursuivies. On a regardé les caractères suivants : la synthèse et le métabolisme de la spectrine, la synthèse et le rôle d'une protéine de la chromatine (IP25),

la synthèse des enzymes nécessaires à la synthèse de l'hème, les changements de l'état de la membrane cellulaire et la synthèse de la globine. Lors de la différenciation des cellules FL, ces caractéristiques apparaissent dans un ordre bien déterminé. La différenciation semble s'effectuer en deux étapes, une étape précoce et une tardive. L'analyse des variants qui ne peuvent accomplir l'ensemble de la différenciation a confirmé cette hypothèse. On a formulé le modèle suivant pour expliquer la différenciation des cellules FL. L'inducteur provoquerait l'induction du programme précoce (EP<sup>1</sup>) qui comporterait la synthèse de la spectrine, IP25, et les enzymes du chemin d'hème. L'expression du programme précoce et l'accumulation d'hème auraient alors deux effets. L'expression du programme précoce serait arrêté et le programme tardif (Ep<sup>1</sup>) mis en marche. Les éléments du programme tardif sont la synthèse de la globine et des antigènes caractéristiques des globules rouges, la limitation de la multiplication des cellules à 3-4 générations et finalement l'expulsion du noyau.

## II. - GROUPE IMMUNOLOGIE

(Marie-Hélène Buc, Martine Damonville, Philippe Dubois, Marc Fellous, Gabriel Gachelin, Rolf Kemler, Dominique Morello, Takashi Muramatsu).

### A) *Etude des composants polysaccharidiques de la surface des cellules de carcinome embryonnaire*

1) A l'aide de lectines marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine. On a utilisé les lectines suivantes : concanavale A, Soybean agglutinin, Fucose binding proteins, Wheat germ agglutinin, Peanut agglutinin, dont les spécificités de récepteur sont respectivement : mannose, galactosamine + galactose, fucose, triose interne impliquant le chitobiose et enfin galactose en position terminale non réductrice, pour étudier d'éventuelles hétérogénéités dans les populations de carcinome embryonnaire et leurs différenciations. A titre de comparaison, différents types cellulaires adultes (thymocytes, lymphocytes, etc.) ont été également étudiés.

Tous ces types cellulaires fixent la concanavale A et la Soybean agglutinin. Il en est de même pour le Wheat germ agglutinin, encore que le nombre de sites accessibles soit très restreint sur les cellules différenciées, qu'elles soient dérivées de carcinome embryonnaire ou de l'adulte.

Par contre, la Peanut agglutinin (PNA) semble se fixer sur les cellules CE, mais non sur les cellules différenciées. Elle se fixe également sur toutes les cellules de la lignée germinale. En pratique, dans le système tératocar-

cinome, la PNA se fixe sur les seules cellules F9<sup>+</sup>. Il en est de même pour la « Fucose binding protein » qui, dans le même système, se fixe exclusivement sur les cellules PNA<sup>+</sup> et F9<sup>+</sup>. Cependant les récepteurs semblent appartenir à des espèces moléculaires distinctes.

Ces récepteurs à FBP et PNA disparaissent au cours de la différenciation *in vitro* tout comme les antigènes F9 avec lesquels il ne sont cependant pas confondus. Il peut être conclu de ces expériences que la différenciation *in vitro* du carcinome embryonnaire s'accompagne de remaniements considérables des polysaccharides de surface, comme le montre la disparition des résidus fucosyl et galactosyl externes.

2) Par l'analyse des glycopeptides de la surface cellulaire. Des cultures de différents types cellulaires sont radiomarquées par différents sucres (galactose, fucose, mannose). Les membranes radiomarquées sont ensuite isolées. Une fraction est analysée pour les glycoprotéines membranaires, l'autre est digérée totalement par la Pronase et les glycopeptides résistant analysés, essentiellement par chromatographie sur Sephadex. Les résultats sont interprétés par référence à des glycopeptides connus, tels ceux des groupes sanguins, ou par référence à des membranes très étudiées, telles celles des fibroblastes.

Les profils d'analyses des glycopeptides extraits de carcinome embryonnaire sont très différents de ceux des fibroblastes : en particulier, on trouve que la majorité de la radioactivité est associée à une (ou plusieurs) espèces macromoléculaires, de poids moléculaire 20 000 - 40 000, qui n'ont été retrouvées dans aucune cellule différenciée. La quantité même de ce matériel de poids moléculaire élevé, varie suivant l'état de la différenciation de la culture et ceci en relation directe d'avec le pourcentage des cellules de type carcinoembryonnaire. Un matériel identique a été retrouvé dans les embryons avant implantation et semble également exprimé sur les cellules testiculaires. L'essentiel des sites récepteurs de FBP et PNA pourrait être associé à cette macromolécule (s) inhabituelle (s). Là encore, la relation avec l'antigène F9 n'est pas établie, bien que cette espèce macromoléculaire ne soit actuellement trouvée que sur les cellules F9<sup>+</sup>.

Les déterminants polysaccharidiques sont associés normalement à une fraction protéique. Le poids moléculaire apparent du matériel intact est alors voisin de 100 000. L'ensemble de ce matériel, là encore, disparaît pendant la différenciation embryonnaire.

La comparaison de ce matériel avec des structures déjà connues (glycopeptides de la thyroglobuline, des immunoglobulines, des antigènes H-2, des mucines, etc.) suggère que sa structure, comme sa composition, en sont différentes.

## B) Etudes sur l'antigène F9

1) Par immunoprécipitation. En principe, des déterminants antigéniques membranaires peuvent, après dissolution en NP40, être précipités sous forme de complexes immuns par le sérum syngénique anti-F9 suivi d'un sérum précipitant les immunoglobulines de souris. Une telle étude, réalisée dans le passé, avait permis d'attribuer à l'antigène F9 une structure voisine de celle des antigènes H-2 ; savoir : une chaîne polypeptidique de poids moléculaire 44 000, associée à une chaîne de poids moléculaire 12 000, la  $\beta_2$ -microglobuline. Les tentatives pour immunoprécipiter l'antigène F9 ont échoué, jusqu'à très récemment. Par contre, si l'on prend comme matériel de départ non pas les cellules entières mais des membranes purifiées, on obtient un « signal » spécifique, qui semble plus complexe qu'attendu. Ce matériel semble contenir du fucose en quantités importantes. Son poids moléculaire est voisin de 40 000. Ces données doivent être considérées comme préliminaires.

2) Par digestion de la surface cellulaire par des enzymes protéolytiques

a) *Par la papaïne.* La papaïne, dans les conditions mêmes qui permettent le relargage des antigènes H-2 sous forme soluble libre un matériel, qui s'agrège spontanément, mais dans lequel on trouve une inhibition de l'activité cytotoxique du sérum anti-F9. Cette préparation d'antigènes F9 « soluble » a été partiellement purifiée. Il semble qu'elle contienne deux fractions actives, de poids moléculaires apparents 100 000 et 40 000. Récemment, il est apparu que cette activité pouvait être maintenue en solution si elle est placée à pH alcalin (8,6). L'activité inhibitrice est très stable, résiste à plusieurs congélations, ainsi qu'à un chauffage prolongé.

b) *Par la collagénase.* Une étude très semblable a été menée sur les mêmes cellules, mais en utilisant cette fois-ci la collagénase. Cet enzyme, à pH légèrement alcalin, libère un matériel parfaitement soluble, qui conserve la capacité d'inhiber spécifiquement la cytotoxicité anti-F9. Là encore, après passage sur colonne de Séphadex, cette activité semble associée à deux pics principaux, de poids moléculaires apparents 80 000 et 40 000. Il semble acquis que la molécule de P.M. 40 000 s'agrège spontanément en formant un dimère 80 000.

Il est possible que les types de matériels isolés par les deux enzymes soient identiques. Leurs propriétés immunologiques doivent être comparées dans un prochain avenir.

3) Par l'utilisation d'un sérum de lapin anti-H-2. Il a été démontré antérieurement qu'il n'existait pas de matériel reconnu par un sérum anti- $\beta_2$ -microglobuline de Souris à la surface des cellules de CE. Du fait de la parenté des structures, on s'attendait à ce qu'il y ait une réaction croisée

entre chaînes lourdes de H-2 et chaînes lourdes de F9. On a utilisé, pour étudier cette réaction, un sérum de lapin anti-chaîne lourde de H-2. Ce sérum qui ne reconnaît strictement que H-2, ne reconnaît rien à la surface des cellules de carcinome embryonnaire, et en particulier pas l'antigène F9. Il semble donc qu'il n'y ait pas de parenté entre les deux antigènes, du moins d'homologie qui serait décelable par un sérum qui par ailleurs reconnaît les produits des MHC d'un grand nombre de mammifères.

#### C) *Etude du sérum anti-F9*

Tant en vue des expériences d'immunoprécipitation que de l'analyse de la réponse anti-F9 elle-même, la composition des sérums anti-F9 a été analysée. Toute l'activité cytotoxique, qui croît au cours des quatre premières immunisations puis reste stable, a été trouvée associée aux IgM. Par contre, une forte activité anti-F9, qui est décelable seulement par immunofluorescence et qui évolue peu au cours de l'immunisation, se trouve associée aux IgG<sub>1</sub>. Des complexes solubles IgM-Ag et IgG<sub>1</sub>-Ag ont été également identifiés. La réponse prédominante en IgM semble ne pas être liée à la souche d'animaux utilisés pour l'immunisation, mais à l'immunogène lui-même. On ne sait pas encore si les activités  $\mu$  et  $\gamma_1$  sont associées aux mêmes sites antigéniques ou non. Cette étude sera menée dans un proche avenir par immunoprécipitation.

#### D) *Antigènes embryonnaires divers*

L'étude de l'expression de divers antigènes au cours de la différenciation embryonnaire et de la différenciation du tératocarcinome a été continuée. Par ailleurs on a tenté d'établir des cellules hybrides Poulet-PCC4, dans le but d'aborder directement la génétique de l'antigène F9. Aucun résultat concluant n'a été obtenu dans ce système. Cependant, dans le système souris/souris, des hybrides stables thymocytes/PCC4 ont été obtenus. Ces hybrides restent capables d'exprimer l'antigène F9. Il est envisagé de reproduire ces expériences dans le système thymocyte t<sup>x</sup>/PCC4, en vue de l'obtention de lignées exprimant les antigènes t<sup>x</sup>.

#### E) *Etude de l'antigène H-Y*

L'antigène H-Y a été décelé par lymphocytotoxicité et immunofluorescence sur une lignée lymphoïde provenant d'un homme atteint d'une tumeur de Burkitt. On a utilisé un sérum de rat anti-HY obtenu par immunisation d'une femelle Lewis par les lymphocytes de mâles Lewis. L'antigène H-Y n'a pas été trouvé sur les 10 lignées lymphoïdes humaines femelles étudiées. Par contre l'antigène H-Y est présent sur toutes les lignées humaines mâles étudiées, à l'exception de la lignée humaine Daudi qui ne possède ni la



$\beta_2$ -microglobuline ni les antigènes d'histocompatibilité HLA. L'antigène H-Y (ainsi que la  $\beta_2$ -microglobuline) n'est pas exprimé sur les lignées de tératocarcinome embryonnaire étudiées (F9, PCC4, LT, ND1 ainsi que PCC7-S et PCC7-S Aza R<sub>1</sub>) bien que ces deux dernières lignées possèdent le chromosome Y, à la différence des 4 premières. Au cours de la différenciation *in vitro* de PCC7-S et PCC7-S Aza R<sub>1</sub>, l'antigène H-Y est décelable sur un tiers des cellules. Toutes les cellules H-Y positives sont aussi  $\beta_2$ -microglobuline positives.

Des expériences de redistribution antigénique sur la lignée Raji ont montré que l'antigène H-Y est associé à la  $\beta_2$ -microglobuline sur la membrane cellulaire tout comme le sont les antigènes H-2 ou HLA, l'antigène TL et Qa.

### III. - GROUPE EMBRYONS DE SOURIS

(Charles Babinet, Hubert Condamine).

#### A) Rôle des antigènes de surface au cours de la différenciation

Un effet éventuel des anticorps anti-F9 sur les premiers stades de la différenciation de l'embryon de souris a été recherché par culture *in vitro* d'embryons, prélevés au stade 2, en présence des anticorps en question. Les anticorps divalents, tant de Souris que de Lapin, se sont révélés sans effet. En revanche les fragments monovalents (Fab), obtenus par digestion à la papaïne d'anticorps de Lapin sont capables d'empêcher la différenciation de la morula en blastocyste, sans pourtant inhiber les segmentations successives de l'œuf. Cet effet est réversible dans certaines limites de temps. En outre, les *morula* obtenues par culture en présence de Fab de Lapin anti-F9 ont une morphologie particulière, en « grappe », du fait que les blastomères restent lâchement associés, au lieu de former une masse compacte. Il est tentant d'interpréter ces faits à la lumière de l'hypothèse souvent avancée selon laquelle la différenciation de la *morula* en blastocyste s'opère à partir du moment où certains blastomères, entourés par d'autres de tous côtés, peuvent être qualifiés d'externes. Les blastomères externes sont ceux dont une partie de la surface est libre. Cette dissymétrie entraînerait un devenir différent, les blastomères externes évoluant en trophoctoderme, les internes en masse cellulaire interne. Il semble que le blocage de certains sites, dont l'identité reste à définir, par les Fab anti-F9 de Lapin empêche cette dissymétrie d'avoir lieu en interdisant l'apparition de cellules internes.

#### B) Génétique de l'antigène F9

Pour tenter d'obtenir des informations sur le contrôle génétique de l'antigène F9, des recherches ont été entamées selon les deux voies suivantes :

1) Recherche d'un éventuel polymorphisme de l'antigène F9 dans les différentes souches de Souris. Cette étude est menée en déterminant, à l'aide d'expériences d'absorption, les quantités d'antigènes présents à la surface des spermatozoïdes des différentes souches. Ont été examinées les souches possédant des haplotypes H-2 d'origine indépendante. Aucune n'a présenté jusqu'ici de différences notables. Il est projeté d'examiner désormais des souris provenant d'animaux capturés dans la nature.

2) Propriétés de recombinants exceptionnels du locus T. Des expériences antérieures ont montré qu'il existe une relation entre l'antigène F9 et les produits de certains haplotypes t. Par exemple, l'haplotype  $t^{w32}$  semble exclure la présence de F9 à la surface des spermatozoïdes et des embryons précoces. On a donc entrepris d'étudier comment segrège le caractère F9+ chez les recombinants exceptionnels de la région t, qui apparaissent à la fréquence d'environ 1/500 chez un hétérozygote  $+/t^{w32}$ . Trois recombinants ont été obtenus cette année. Pour l'un, un stock a été constitué, qui le rend prêt pour cette étude. La préparation d'un stock semblable pour les deux autres recombinants, et l'obtention de recombinants supplémentaires est en cours.

### C) *Essais d'obtention d'un tératocarcinome porteur de mutation t*

Le locus T gouverne l'expression d'antigènes de surface présents sur les spermatozoïdes et aux stades précoces de l'embryogenèse. On s'attend donc qu'un tératocarcinome porteur d'une mutation t exprime l'antigène correspondant et en permette l'étude de la structure et du fonctionnement. Pour obtenir un tel tératocarcinome, il a été procédé à l'implantation, sous la capsule testiculaire d'un receveur convenable, d'embryons provenant de parents hétérozygotes pour l'haplotype  $t^{w18}$  et prélevés au jour 4, 6 ou 7 de leur développement (les embryons homozygotes  $t^{w18}/t^{w18}$  meurent au jour 8). Dans ces conditions, l'embryon peut donner naissance à une tumeur qui est prélevée au bout de trois semaines, mise en culture d'une part, réinjectée d'autre part pour tenter d'obtenir un matériel indéfiniment retransplantable. A partir de 84 blastocystes réimplantés, 14 tumeurs primaires ont ainsi été obtenues. A partir de 118 embryons prélevés au jour 6 ou 7 de leur développement, 54 tumeurs ont été obtenues. Malheureusement, aucune des 68 tumeurs obtenues à ce jour ne s'est révélée être retransplantable, soit que ces tumeurs se trouvent rejetées par les animaux dans lesquels elles sont réinjectées, soit que jusqu'à présent elles aient comporté une trop faible minorité de cellules de carcinome embryonnaire (qui sont responsables de la formation de tumeurs lorsqu'on passe en série un tératocarcinome). Ces expériences sont poursuivies pour augmenter le nombre de tumeurs primaires examinées, et, par suite, la chance d'en trouver une qui soit retransplantable.

Les tératomes primaires sauvages ou hétérozygotes se développent bien *in vitro* en donnant des différenciations multiples et, à partir d'un tératome hétérozygote, on a pu obtenir une lignée endodermique, transplantable *in vivo* par voie intrapéritonéale.

Par contre, deux tératomes primaires homozygotes obtenus ont une croissance *in vitro* très limitée. Cependant après infection par SV40 on a obtenu, dans les deux cas, une culture de cellules myoblastiques, caractérisée par la présence de myotubes et de la phosphocréatine-kinase spécifique du muscle strié. L'obtention, jusqu'à présent exclusive, de dérivés de type myoblastique à partir de tératomes homozygotes est étonnante car on sait, par des travaux antérieurs, que ces tératomes sont constitués essentiellement de dérivés de type neuroectodermique. On sait cependant que tous les types cellulaires ne peuvent être également infectés et transformés par SV40. On pourrait envisager qu'à côté de dérivés neuroectodermiques non transformables se trouvent des précurseurs des cellules myoblastiques dont la transformation rend la croissance possible. Des expériences sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

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

Les mutations létales récessives représentent un groupe très hétérogène d'altérations génétiques ayant en commun la caractéristique d'empêcher le développement normal de l'embryon. Bien que ces mutations représentent un matériel de choix pour l'analyse génétique du développement embryonnaire, elles ont été très peu étudiées : a) parce qu'elles sont difficiles à obtenir et à entretenir (sauf dans certains cas très favorables tels que t-haplotypes ; effets dominants à l'état hétérozygote, etc.) ; b) parce qu'elles nécessitent, en général, une étude « *in utero* » et qu'il est assez difficile d'analyser la dynamique de la malformation et ses causes. C'est sur la recherche et l'analyse de tels mutants qu'une bonne part du travail a été consacrée.

##### A) *Obtention et identification de mutations létales récessives*

La plupart des mutations létales récessives déjà identifiées chez la souris ont un effet dominant à l'état hétérozygote (exemple de T : Brachyury modifiant la forme et la longueur de la queue de l'hétérozygote et létales à l'état homozygote vers le 12<sup>e</sup> jour de gestation).

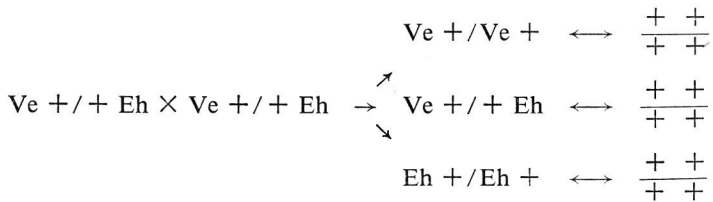
Certaines ont été identifiées par hasard en raison d'interactions alléliques récessives avec des mutations déjà connues (exemple :  $a^x$  mutation létale récessive radio-induite au locus A ayant un effet récessif en association avec a.  $a^x/a \rightarrow$  non agouti  $a^x/a^x$  létales).

On a cherché à éviter ce biais expérimental en essayant d'induire, avec des agents mutagènes, des mutations létales récessives à des loci inconnus. Pour cela on a utilisé plusieurs techniques plus simples et plus efficaces. On a ainsi isolé et reconnu trois mutations létales récessives. L'une est liée au locus de C (albinisme) et est létale tardive. Les deux autres sont liées au locus brachypodism bp et sont imparfaitement connues à l'heure actuelle. Le « rendement » en mutations létales récessives identifiées dans cette région correspond parfaitement aux prévisions théoriques telles qu'elles ont été établies par A. G. Searle and coll. (Radiation Biology).

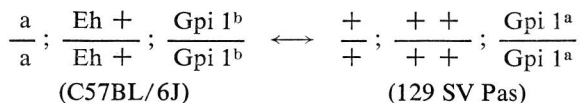
B) *Etude des mutations létales récessives*

L'analyse du développement des embryons homozygotes pour une mutation létale récessive s'arrête assez souvent au stade de l'observation histologique. Il s'agit donc de résultats essentiellement morphologiques qui ne permettent pas de conclure sur la nature de l'altération génétique : mutation létale cellulaire ou mutation de différenciation. Pour lever cette ambiguïté, on a cherché à savoir s'il était possible de « sauver » certains mutants de la mort *in utero* en leur prêtant des cellules normales provenant d'un embryon sauvage. En utilisant les circonstances avantageuses qui existent sur le chromosome 15 de la souris nous avons constitué un stock doublement muté  $Ve +/+ Eh$  où à la fois  $Ve$  (Velvet Coat) et  $Eh$  (Hairy ears) sont des mutations létales récessives.

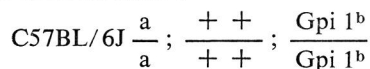
On a ensuite réalisé des fusions allophéniques que l'on peut schématiser de la façon suivante :



Et en étudiant les individus chimériques, on a pu identifier un animal (une femelle) ayant la constitution génétique suivante :



Cette femelle croisée avec un mâle :



ne produit qu'un seul type de descendant  $a : a$  (noir non agouti) =  $Eh/+$ . Ceci prouve qu'il est possible d'obtenir un animal vivant dont une partie

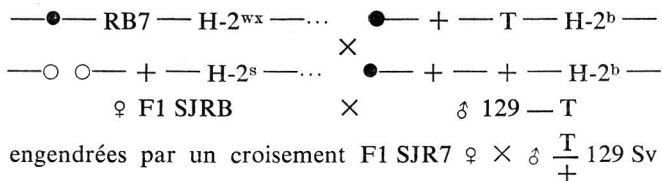
des cellules provient d'un embryon incapable de se développer normalement jusqu'à terme et que, par conséquent, l'anomalie génétique en question intéresse la différenciation cellulaire. Le type complémentaire  $Ve/Ve$  n'a pas pu (jusqu'à présent) être « sauvé » par la technique allophénique.

C) *Etudes génétiques à propos du locus T*

A côté des expériences concernant la biologie du développement de la souris ci-dessus mentionnée, on a procédé à une analyse génétique du locus  $t$  destinée à en connaître la nature.

D'après les études conduites par les généticiens des populations, et en particulier par R. Lewontin, on peut conclure qu'une mutation  $t$  létale a tendance à être éliminée d'une population sauvage, et cela en dépit d'une transmission non mendélienne favorisant cet haplotype. Il faut donc admettre que, de temps en temps, des mutations  $+ \rightarrow t$  doivent survenir puisque la fréquence des haplotypes  $t$  est élevée dans les populations sauvages.

En utilisant un système de marqueur approprié (représenté ci-dessous), nous avons cherché à analyser la constitution génétique des individus sans queue.



→ 13 cas ont été analysés à l'heure actuelle parmi lesquels 10 ont été classés  $T/+$  forte pénétrance et 3 sont encore en cours d'étude.

Aucun animal jusqu'à présent n'a pu être reconnu porteur, à l'état hétérozygote, d'un haplotype  $t$  néoformé en dépit d'un phénotype « sans queue ». Ceci ne permet donc pas (au moins pour l'instant) d'étayer l'hypothèse selon laquelle des haplotypes  $t$  pourraient apparaître par recombinaison plus ou moins égale entre deux segments du chromosome 17. D'autres expériences, plus précises (sélection préalable des recombinants entre  $T$  et  $t$ ), sont en cours.

PUBLICATIONS

F. JACOB, *Mouse teratocarcinoma and embryonic antigen (Immunological Rev., 1977, 33, 3-32).*

P. AVNER, P. DUBOIS, J. F. NICOLAS, H. JAKOB, J. GAILLARD et F. JACOB, *Mouse teratocarcinoma : carbon source utilization patterns for growth and in vitro differentiation (Exp. Cell. Res., 1977, 105, 39-50).*

R. P. ERICKSON, G. GACHELIN, M. FELLOUS et F. JACOB, *Absorption analysis of H-2D and K antigens on spermatozoa (J. Immunogenetics, 1977, 4, 47-51).*

F. JACOB, *Evolution and Tinkering (Science, 1977, 196, 1161-1166).*

C. BABINET, R. KEMLER, P. DUBOIS et F. JACOB, *Les fragments monovalents d'immunoglobulines de Lapin anti-F9 empêchent la formation de blastocystes chez la Souris (C.R. Acad. Sci. Paris, 1977, 284, 1919-1922).*

G. GACHELIN, R. KEMLER, F. KELLY et F. JACOB, *PCC4, a new cell surface antigen common to multipotential embryonal carcinoma cells, spermatozoa and mouse early embryos (Develop. Biol., 1977, 57, 199-209).*

M. JACQUET, N. AFFARA, H. JAKOB, J. F. NICOLAS, F. JACOB et F. GROS, *Complexity of polysomal messenger RNA in mouse teratocarcinoma cell lines. In « The organization and expression of the eukaryotic genome ».* (E. M. Bradbury et K. Javaherian, *Academic Press, 1977, 357-372).*

Y. REISNER, G. GACHELIN, P. DUBOIS, J. F. NICOLAS, N. SHARON et F. JACOB, *Interaction of peanut agglutinin, a lectin specific for non reducing terminal D-galactosyl residues, with embryonal carcinoma cells (Develop. Biol., 1977, 61, 20-27).*

R. KEMLER, C. BABINET, H. EISEN et F. JACOB, *Surface antigen in early differentiation (Proc. Nat. Acad. Sci., 1977, 74, 4449-4452).*

N. A. AFFARA, M. JACQUET, H. JAKOB, F. JACOB et F. GROS, *Comparison of polysomal polyadenylated RNA from embryonal carcinoma and committed myogenic and erythropoietic cell (Cell, 1977, 12, 509-520).*

B. HOGAN, M. FELLOUS, P. AVNER et F. JACOB, *Isolation of a human teratocarcinoma cell line which expresses the F9 antigen (Nature, 1977, 270, 515-518).*

C. CUDENNEC et J. F. NICOLAS, *Blood formation in a clonal cell line of mouse teratocarcinoma (J. Embryol. Exp. Morphol., 1977, 38, 203-210).*

G. GACHELIN, *Le tératocarcinome expérimental de la souris : un système modèle pour l'étude des relations entre antigènes de surfaces cellulaires et différenciation embryonnaire (Bull. du Cancer, 1976, 63, 95-110).*

J. L. GUENET, *Cell surface antigen during early mouse embryogenesis (5<sup>e</sup> Conférence « European Teratology Society », Gargnano, 1976, suppl. 2, S III 5).*

R. P. ERICKSON, *Gene expression of a region of chromosome 17 during murine spermatogenesis (J. Immunogenetics, 1977, 4, 353-362).*