

## Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Le cours de cette année a été consacré à l'étude de la membrane des cellules embryonnaires aux stades précédant l'implantation chez la souris. Il n'existe encore aucune preuve directe permettant d'attribuer à la membrane cellulaire un rôle précis dans les phénomènes qui président au développement de l'embryon au cours des stades précoces. Toutefois, à la différenciation cellulaire sont étroitement liés les processus de croissance et l'organisation des formes. La différenciation des cellules doit donc, d'une manière ou d'une autre, être liée à leur position dans l'embryon. Il est généralement admis, par exemple, que lors du premier choix offert aux cellules, c'est leur place à l'intérieur ou à l'extérieur de la morula qui décide du sort d'une cellule : selon l'hypothèse proposée par Tarkowski, les cellules externes formeraient le trophoctoderme du blastocyste, les cellules internes donnant le « bouton embryonnaire » ou « masse cellulaire interne ». Il en est de même, lors du second choix offert aux cellules de la masse interne : les cellules de la surface vers le blastocèle forment l'endoderme primitif tandis que les cellules profondes donnent l'ectoderme. Selon toute vraisemblance, certains phénomènes impliqués dans ces événements mettent en jeu la membrane des cellules embryonnaires.

Aux stades précédant l'implantation, l'étude de la membrane cellulaire est rendue difficile par la rareté du matériel. Les quelques tentatives faites dans cette direction n'ont donné que des résultats incertains. Il est possible de tourner certaines de ces difficultés en utilisant le tératocarcinome de la souris comme matériel d'analyse en guise de cellules embryonnaires.

On a brièvement résumé les propriétés du tératocarcinome de la souris, propriétés qui avaient été exposées en détail dans le cours de l'année précédente. On a notamment rappelé les propriétés des cellules de carcinome embryonnaire (CE) capables de donner naissance aux dérivés des trois feuilletts embryonnaires. Par leurs propriétés morphologiques, biochimiques, immunologiques et leur capacité de différenciation, ces cellules CE s'apparentent aux cellules précoces de l'embryon, plus particulièrement à celles de la masse interne ou de l'ectoderme embryonnaire. En fait, les différentes

lignées de cellules CE isolées depuis quelques années ne semblent pas identiques. Il n'est pas exclu qu'elles correspondent à des stades légèrement différents du développement embryonnaire.

Quoi qu'il en soit, il est possible d'effectuer sur ces cellules une série d'expériences biochimiques ou immunologiques difficiles à mener à bien directement sur l'embryon. Une fois certains résultats acquis, on peut alors rechercher dans quelle mesure ils sont transposables à l'embryon. C'est ainsi qu'a pu commencer l'étude de la membrane cellulaire chez l'embryon précoce. Pour la commodité de l'exposé, les renseignements obtenus peuvent être provisoirement classés sous trois rubriques, selon la technique utilisée.

#### A. - *Glycopeptides*

Les glycopeptides des cellules CE ont été étudiés selon la méthode classique : les cellules sont marquées par un sucre radioactif, puis digérées pendant 48 heures avec un excès de pronase. Après centrifugation et lyophilisation, cette préparation est placée sur une colonne de Séphadex G-50. Dans la plupart des cellules adultes, les glycopeptides ont un poids moléculaire de 2 à 3 000. Ils correspondent à deux types principaux appelés « glycopeptides riches en mannose » et « glycopeptides complexes ». Chez les cellules CE, on peut mettre en évidence la présence de glycopeptides du premier type mais non du second. En outre, on trouve des glycopeptides de poids moléculaire beaucoup plus élevé qui migrent près du volume exclu. Ce dernier type contient du fucose, du galactose, de la glucosamine mais peu, ou pas, de mannose. La structure de ce type de glycopeptide est actuellement à l'étude.

Ces glycopeptides de haut poids moléculaire se trouvent sur toutes les lignées de cellules CE examinées. En revanche, on ne les trouve sur aucun des types cellulaires différenciés examinés provenant, soit de tératomes, soit de souris adultes. Au cours de la différenciation *in vitro* de cellules CE, ces glycopeptides disparaissent rapidement. En utilisant les mêmes techniques, on peut mettre en évidence la présence de tels glycopeptides de haut poids moléculaire aux stades embryonnaires précédant l'implantation.

#### B. - *Lectines*

On a mesuré la fixation d'une série de lectines sur des cellules CE ou des dérivés différenciés de cellules CE. Pour certaines d'entre elles, concanavoline, agglutinine de germe de blé, agglutinine de soja, on ne note pas de différences appréciables. Pour deux autres en revanche, la lectine de

cacahuète (Peanut agglutinin ou PNA spécifique pour les résidus galactosyl terminaux) ou pour la lectine de lotus (fucose binding protein, spécifique de résidus fucosyl), on observe des différences appréciables. Les cellules CE fixent en effet ces deux lectines en quantités notables, environ 2 à  $5 \cdot 10^5$  molécules par cellule. En revanche, les dérivés différenciés de cellules CE ne fixent pas de manière significative ces deux lectines. Au cours de la différenciation *in vitro* des cellules CE, on voit rapidement diminuer, puis disparaître à peu près totalement l'affinité des cellules pour ces deux lectines. Enfin, ces dernières sont fortement fixées par les cellules de morula.

Il semble ainsi y avoir un parallélisme entre la présence des glycopeptides à haut poids moléculaire et celle des récepteurs de PNA ou de FBP.

### C. - Antigènes de surface

On ne peut déceler les produits du complexe majeur d'histocompatibilité H-2 à la surface des cellules CE. Ni les alloantisérums, ni les lymphocytes T tueurs anti-H-2<sup>b</sup> ne réagissent avec les cellules CE issues de la souris 129 (H-2<sup>bc</sup>). De même on n'observe aucune réaction avec un sérum de lapin immunisé avec une chaîne lourde du complexe H-2, sérum qui réagit avec les haplotypes H-2 de la souris et les antigènes d'histocompatibilité majeurs de nombreux mammifères. De même, on ne décèle pas de  $\beta$ -2 microglobuline, chaîne légère des antigènes d'histocompatibilité à la surface de ces mêmes cellules.

Toute une série de sérums a été préparée par immunisation de cellules CE. On a résumé les propriétés des sérums d'animaux syngéniques ou hétérogéniques.

1) *Sérum de souris syngéniques.* L'immunisation de souris mâles 129 avec les cellules CE de la lignée F9 (Dérivée d'un tératocarcinome testiculaire de la souris 129) produit un sérum très actif sur les cellules F9 dans des expériences de cytotoxicité directe, en présence de complément, ou d'immunofluorescence indirecte. Ce sérum syngénique anti-F9 réagit avec toutes les lignées de cellules CE, quelle que soit leur origine, mais la fraction des cellules réactives varie de 50 à 100 % selon les lignées. Il ne réagit avec aucun type de cellules différenciées dérivées du tératocarcinome, ni avec les cellules somatiques de l'adulte. En revanche, il réagit avec la lignée germinale mâle, à tous les stades depuis le gonocyte jusqu'au spermatozoïde.

Chez l'embryon, on observe une réaction 6 heures après la fécondation. L'intensité de la réaction augmente jusqu'au stade morula. Chez le blastocyste, les deux types cellulaires réagissent avec le sérum anti-F9. Après implantation, le sérum réagit sur l'ectoderme embryonnaire jusqu'au 9<sup>e</sup> jour.

Ce sérum syngénique anti-F9 réagit ainsi avec les embryons des diverses lignées de souris étudiées, consanguines ou non. Il réagit également avec les embryons ou les spermatozoïdes d'une série de mammifères : kangourou, rat, lapin, porc, bœuf et homme. En revanche, aucune réaction n'a été observée avec le poulet ou la grenouille.

L'analyse de ces sérums syngéniques anti-F9 a montré récemment la présence d'au moins deux types d'anticorps : IgM, possédant une activité cytotoxique sur les cellules F9 en présence de complément et IgG1 dépourvus d'activité cytotoxique. L'absorption de sérum anti-F9 par le sperme de souris enlève les IgM mais non les IgG1. Il semble donc probable que deux antigènes au moins sont reconnus par ce sérum. Ces antigènes n'ont pas encore été caractérisés chimiquement.

2) *Sérum de lapin*. Un sérum a été préparé par Edidin et ses collaborateurs en immunisant des lapins avec des cellules d'un tératocarcinome (appelé 402 AX) issu de la souris 129. Par absorption sur une série de lignées cellulaires, il est possible de montrer que ce sérum reconnaît trois antigènes de surface distincts.

A l'Institut Pasteur, des lapins ont été immunisés avec des cellules CE F9. Ces sérums contiennent des anticorps dirigés contre plusieurs antigènes de surface : un commun aux cellules CE, aux embryons avant implantation et aux lymphocytes ; un autre présent seulement à la surface des cellules CE et des embryons encore non implantés. Les fragments monovalents, Fab des IgG dirigés contre ce dernier antigène (mais non les IgG multivalents) présentent un effet inhibiteur très marqué sur la différenciation de l'embryon et des cellules CE *in vitro*. Cultivés *in vitro* en présence de fragments Fab, les embryons prélevés au stade 2 cellules se clivent normalement mais l'embryon ne prend pas une forme compacte comme les témoins ; les cellules forment une structure en grappe qui ne se différencie pas en blastocyste. Toutefois, cet effet est réversible pendant quelques heures : une fois lavées et remises dans un milieu dépourvu de fragments Fab, ces structures prennent une forme compacte en 2 ou 3 heures ; les morulas ainsi formés se différencient en blastocystes qui, réimplantés dans des souris convenablement préparées, produisent des souriceaux avec la même efficacité que les blastocystes normaux. Cet effet est spécifique car il ne se retrouve pas avec trois autres préparations Fab à partir d'IgG de lapins dirigés contre d'autres antigènes présents à la surface des blastomères.

Les fragments monovalents d'IgG dirigés contre les cellules CE F9 empêchent également la différenciation de la masse cellulaire interne (préparée par immunochirurgie du blastocyste) ainsi que des cellules CE elles-mêmes. La cible reconnue par les IgG de lapin contre les cellules F9 n'a pas encore été identifiée.

Quoi qu'il en soit, ces expériences mettent en évidence le rôle de la surface cellulaire au cours des premiers stades du développement embryonnaire, avant implantation de l'embryon. Pour conclure, on a discuté les mécanismes possibles de l'effet Fab ainsi que les possibilités d'expérimentation offertes par ce système pour analyser les étapes précoces du développement embryonnaire.

F. J.

#### SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires sur les reconnaissances cellulaires et le développement embryonnaire.

M. Jean-Paul THIERY, Chargé de recherches au C.N.R.S., a donné un séminaire sur le mécanisme moléculaire de l'adhérence cellulaire dans le système nerveux de l'embryon de Poulet.

M<sup>me</sup> Alena LENGEROVA, Professeur à l'Institut de Génétique Moléculaire de Prague, a fait un exposé sur « The role of H-2 genes products in non-immune cell-cell interactions : structure-function relationships ».

M. Pierre GUERRIER, Maître de recherches au C.N.R.S., a décrit les phénomènes membranaires précoces responsables de la reprise de la méiose dans l'ovocyte d'Etoile de mer.

M<sup>me</sup> Hoang-Oanh NGHIEM, Chargée de recherches au C.N.R.S., a donné un séminaire sur les récepteurs de surface au cours du développement embryonnaire chez le Poulet.

M. Jacques THEZE, Chargé de recherches à l'Institut Pasteur, a exposé l'étude d'un médiateur supprimeur spécifique codé par la région H-2 de la Souris.

M. Jacques CHARLEMAGNE, Professeur sans chaire à l'Université Pierre-et-Marie-Curie, a donné un séminaire sur la phylogénie de la fonction thymique chez les vertébrés.

M<sup>me</sup> Françoise DIETERLEN-LIEVRE, Maître de recherches au C.N.R.S., a fait un exposé sur « Origine, migration et potentialités des cellules souches sanguines embryonnaires, étudiées chez des chimères d'Oiseau ».

M. Hubert CONDAMINE, Sous-Directeur de laboratoire au Collège de France, a donné deux séminaires sur le rôle de H-2 dans la spécificité fonctionnelle des cellules T.

## 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* (Michel DARMON, Harvey EISEN, François JACOB, Hedwig JAKOB, Françoise KELLY, Jean-François NICOLAS).

### A. - *Tentative d'isolement de lignées à potentialités « restreintes »*

Une série de clonages a été effectuée à partir de cellules de carcinome embryonnaire (CE) multipotentielles provenant d'un tératocarcinome de la souris C3H. Certains des clones isolés diffèrent de la lignée initiale. Dans les conditions habituelles d'injection, ils ne sont pas tumorigènes. Toutefois, ils forment des tumeurs soit après injection intratesticulaire, soit après irradiation (600 R) des animaux. Dans ces tumeurs, les différenciations semblent se limiter à des tissus de type nerveux alors que la lignée initiale produit avec régularité des tissus appartenant aux trois feuilletts embryonnaires. A partir d'une de ces lignées, on a ainsi isolé une dizaine de clones et de sous-clones présentant des morphologies différentes (soit de type CE, soit d'aspect différencié). Tous ces clones produisent des tumeurs uniquement chez les animaux irradiés et contiennent exclusivement des tissus de type nerveux. Pour certains de ces clones, les potentialités de différenciation semblent n'être pas strictement réduites aux tissus d'origine ectodermique. C'est en effet ce que montre le traitement de ces cellules par l'azacytidine. Ce composé est connu pour convertir phénotypiquement certaines cellules fibroblastiques en cellules de type myogénique. Appliqué aux cultures de nos clones, il donne naissance à des zones de fibres musculaires multinucléées. On s'efforce maintenant d'obtenir une caractérisation plus précise de type cellulaire formé par la différenciation de certains de ces clones.

B. - *Analyse d'une lignée myogénique (T 984)*

A partir de la même lignée de tératocarcinome C3H a été isolé un clone de myoblastes (appelé T 984). Ces cellules produisent avec une fréquence élevée une différenciation à muscle strié. Dans des conditions appropriées elles peuvent aussi fournir trois phénotypes cellulaires différents : cellules de muscle squelettique, adipocytes et fibroblastes. Les glucocorticoïdes bloquent irréversiblement la formation de myotubes à partir de cellules T 984, tout comme elles bloquent celles des myoblastes en culture primaire à partir de l'embryon. Les cultures non musculaires T 984 ont conservé le pouvoir de se différencier en tissu musculaire. En effet sous l'action de l'azacytidine, on peut observer la formation de plages de tissu musculaire.

En étudiant les propriétés de clones produits après traitement des cellules T 984 par la dexaméthazone, on espère obtenir des précisions sur les transitions entre ces différents types cellulaires.

C. - *Effets de l'héxaméthylène bisacétamide (HMBA)*

On a montré l'année dernière que dans certaines lignées de ces cellules CE, l'ensemble d'une population était induite à se différencier en un type cellulaire par l'action de l'HMBA. Cette étude a été poursuivie. On a constaté que différentes lignées de cellules CE se comportaient de façon différente à l'égard de l'HMBA. Celle-ci peut exercer un effet inducteur soit sur l'ensemble d'une population de certaines lignées, soit sur une fraction de la population d'autres lignées ; enfin, elle peut exercer un effet toxique. Malgré des efforts répétés avec la lignée dont l'ensemble de la population se différencie, on n'a pu obtenir de cellules résistantes à l'action de l'HMBA.

Les populations des cellules différenciées formées par l'action de l'HMBA ont été étudiées en détail. Il a été montré notamment, en collaboration avec Denise Paulin, que les types de protéines formés ne sont pas exactement les mêmes que ceux trouvés chez les cellules CE non traitées. On note, en particulier après action de l'HMBA, une forte augmentation de synthèse de tropomyosine. Cette synthèse peut être liée à l'organisation de l'actine en câbles, comme on l'observe après traitement par l'HMBA, mais non chez les cellules CE.

D. - *Etude de la coopération métabolique entre cellules CE et cellules différenciées*

Les cellules déficientes en hypoxanthine-phosphoribosyl-transférase (HPRT<sup>-</sup>) se lysent en milieu HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine).

Elles peuvent être protégées par « coopération métabolique », quand elles sont cultivées en présence de cellules HPRT<sup>+</sup>. Cet effet de protection a pu être quantifié et utilisé pour étudier l'adhérence cellulaire et les communications entre cellules de différents types. Il a pu ainsi être montré que les cellules de CE peuvent coopérer métaboliquement avec toutes les autres lignées de CE murins et même certaines lignées humaines. En revanche, elles ne coopèrent avec aucune autre des cellules différenciées qui ont été étudiées. Cette étude a pu être confirmée par une autre méthode. La thioguanine est métabolisée par les cellules de type sauvage et donne naissance à des dérivés toxiques. Ceux-ci peuvent être transmis à des cellules mutantes et provoquer leur lyse. Si ces cellules mutantes sont préalablement marquées par un composé radioactif, la mesure de la radioactivité libérée par la lyse fournit une mesure de la coopération métabolique et de la communication entre cellules.

Cet effet toxique de la thioguanine peut être utilisée pour l'isolement de mutants incapables de coopération. La recherche de tels mutants est en cours.

E. - *Effet de fragments monovalents de sérum de lapin anti-F9 sur les cellules de CE*

On a constaté l'année dernière que les fragments monovalents Fab d'un sérum de lapin anti-F9 empêchent l'embryon de prendre sa forme compacte au stade morula, ce qui arrête la différenciation de la morula en blastocyste. On a constaté cette année que les mêmes fragments Fab de ce sérum ont des effets semblables sur l'adhérence et l'aggrégation des cellules CE. Ces effets ont été étudiés sur une série de lignées CE d'origines différentes. Les fragments Fab inhibent l'adhérence intercellulaire dans la majorité des lignées CE. Toutefois, certaines lignées CE semblent insensibles à cet effet. Il est cependant possible de rechercher une interaction de ces cellules négatives avec le sérum de la manière suivante. Le sérum est d'abord absorbé sur ces cellules puis son activité éprouvée sur des cellules sensibles pour son effet anti-aggrégation.

On a étudié l'effet des fragments Fab sur la coopération métabolique entre cellules CE (PCC3 et PCC4Aza<sup>R</sup>). La coopération est totalement inhibée par les fragments monovalents Fab anti-F9.

Certaines lignées différenciées, telle que la lignée PYS ou une lignée trophoblastique isolée à partir de cellules CE, semblent porter les structures réagissant avec les fragments Fab. Toutefois la plupart des autres lignées différenciées étudiées semblent dépourvues de ces structures.



F. - *Etude de l'expression des virus SV40  
et polyome dans le tératocarcinome de la souris*

1) Afin de suivre l'expression d'un génome viral intégré au cours de la différenciation dans le tératocarcinome, on a isolé des hybrides entre cellules CE (cellules PCC4 Aza-1 résistantes à l'azaguanine) et cellules transformées par SV40 (cellules SVT2-X, résistantes au BudR et dérivées de la lignée des fibroblastes de souris SVT2 qui a l'avantage d'être pseudodiploïde et d'avoir un nombre de copies de génome viral bien défini). Plusieurs colonies de type CE résistantes au milieu HAT ont été isolées. Ces cellules sont négatives pour l'antigène T de SV40 et ont un caryotype aux environs de 40 chromosomes. Il n'a pas encore été possible d'établir avec certitude qu'elles contiennent un segment chromosomique provenant de la cellule SVT2-X et portant un génome viral.

Cependant la plupart des colonies obtenues dans ce croisement ne sont pas faites de cellules de type CE. On trouve des colonies de type fibroblastique, les plus fréquentes (F), et des colonies d'un type cellulaire différent (D). Deux colonies de type (F), F1 et F10, et deux colonies de type (D), D1 et D2 ont été isolées et sont effectivement des hybrides car leur caryotype est subtétraploïde et contient des marqueurs chromosomiques appartenant aux deux cellules parentales. On a d'autre part examiné ces cellules pour la présence de caractères appartenant soit à la cellule SVT2-X (présence de l'antigène T, induction de fibrosarcomes dans la souris, présence de l'antigène d'histocompatibilité H-2<sup>d</sup> de la souche Balb/c) soit à la cellule PCC4 (présence des composants  $\mu$  et  $\gamma$  de l'antigène F9).

Les résultats indiquent que ces différents caractères segrègent indépendamment dans les hybrides examinés. Trois de ces hybrides (F1, F10 et B1) sont plutôt de type fibroblastique; ils diffèrent cependant de la cellule SVT2-X, car ils gardent le composant  $\gamma$  de l'antigène F9 et ainsi expriment le caractère tumorigénicité avec des efficacités diverses. Le quatrième, B2, a des propriétés différentes : il ne s'agit plus d'un fibroblaste car les tumeurs obtenues sont des sarcomes d'un type différent et ses propriétés antigéniques le rapprochent des cellules de carcinome embryonnaire. Ces cellules pourraient représenter un stade intermédiaire de différenciation. C'est aussi dans cet hybride que le défaut d'excision du génome viral est le plus marqué, ce qui encourage à penser que de tels hybrides peuvent être utiles pour étudier les effets du génome de l'hôte sur l'expression des gènes viraux.

2) Etude de la transcription du virus polyome dans les cellules CE PCC4. Les travaux récents de S. Segal, à Bethesda, ont montré que dans les cellules F9 infectées par SV40, il y a transcription du génome viral, mais qu'on trouve seulement la forme précurseur des deux messagers précoces (qui déterminent

les protéines T et t). En collaboration avec Robert Kamen (ICRF, Londres) on a entrepris d'examiner la transcription du polyome dans les cellules PCC4. S'il est possible de généraliser à d'autres virus et d'autres lignées de carcinome embryonnaire, le défaut d'épissage (« splicing ») suggéré pour F9 et SV40, il deviendra très intéressant d'utiliser les systèmes de différenciation *in vitro* afin d'examiner comment apparaissent le ou les mécanismes permettant la maturation des messagers viraux.

#### G. - Etablissement de lignées cellulaires portant la mutation $t^{w18}$

On a poursuivi les tentatives d'isolement d'un tératocarcinome transplantable portant la mutation  $t^{w18}$  à l'état hétérozygote ou homozygote. (L'utilisation du marqueur chromosomique Rb7, qui résulte d'une fusion centrique entre un chromosome 16 et un chromosome 17 permet de définir le génotype du matériel manipulé).

On a déjà rapporté l'obtention de deux tératomes primaires homozygotes. Ces deux tumeurs avaient une croissance *in vitro* très limitée et n'avaient pu être maintenues en culture qu'après transformation par SV40. Dans les deux cas, on a obtenu une culture de cellules myoblastiques, caractérisées par leur capacité à fusionner en donnant des myotubes et la présence de la phosphocréatine-kinase spécifique du muscle strié. Depuis, on a obtenu un troisième tératome homozygote présentant, comme les deux précédents, une croissance limitée en culture. Après transformation par SV40, on a cette fois isolé des cellules adipocytiques. Comme les myoblastes, les adipocytes sont d'origine mésodermique et il est possible de passer de diverses manières d'un type cellulaire à l'autre, ce qui suggère un précurseur commun. Ces résultats indiquent l'existence dans ces tumeurs de cellules précurseurs mésodermiques qui constitueraient des cibles privilégiées pour la transformation par SV40. Ils montrent de plus que l'effet de la mutation sur la croissance cellulaire peut être surmonté par la transformation. En utilisant des mutants tsA de SV40, on peut espérer obtenir des cellules qui s'arrêteraient de croître à la température non permissive. De telles lignées devraient permettre de mieux comprendre la nature du défaut dû à la mutation  $t^{w18}$ .

#### H. — Etudes sur les protéines de chromatine et leur rôle dans la différenciation cellulaire

On a décrit précédemment une protéine de chromatine appelée l'IP25. Cette protéine est induite pendant la différenciation érythroïde des cellules érythroleucémiques transformées par le virus de Friend. Chimiquement, elle se comporte comme l'histone H1. Elle est éluée de la chromatine par les concentrations de sels au-dessus de 0.5 M et par l'acide perchlorique à

5 %. Comme H1, elle est riche en lysine (20 % des acides aminés). L'IP25 apparaît très tôt après addition d'inducteurs de cellules FL et sa synthèse s'arrête en même temps que la synthèse de globine commence. Cela indique que l'IP25 fait partie du programme précoce de la différenciation des cellules FL, tout comme la spectrine et les enzymes nécessaires à la synthèse d'hème. Afin d'étudier le rôle *in vitro* de l'IP25, on a purifié la protéine à partir des cellules FL et on a induit les anticorps spécifiques dans le lapin. Avec ces anticorps, on a développé un dosage d'immunofluorescence indirecte et un système d'immunoprécipitation. On trouve l'IP25 dans les cellules de types très variés : neurones du cortex, cellules de Purkinje et grains du cervelet, cellules bipolaires et ganglionnaires de la rétine, cellules granuleuses de la peau, cellules de Leidig du testicule, cellules de la thèque de l'ovaire, hépatocytes, prothymocytes, etc.

Chez la souris, on a regardé de près le métabolisme de l'IP25 dans les prothymocytes. Ces cellules sont faites dans la moelle osseuse et stockées dans la rate avant de passer dans le thymus où elles se différencient en thymocytes. Dans les souris normales la moelle osseuse contient 2 à 4 % de prothymocytes et la rate en contient 1 à 3 %. Chez la souris nude (nu/nu) qui n'a pas de thymus, il y a 10 à 30 fois plus de prothymocytes qui s'accumulent dans la moelle osseuse et dans la rate. On peut purifier ces cellules à l'aide d'anticorps spécifiques contre leurs antigènes de surface. On peut également faire différencier les prothymocytes en thymocytes fonctionnels en les étalant sur des cellules d'épithélium de thymus ou en les traitant avec l'hormone thymopoïétine ou avec l'AMP cyclique. Avec le Docteur S. Waksal à Tufts University, on a examiné la présence et le métabolisme de l'IP25 dans les prothymocytes de moelle osseuse, de rate et en cours de différenciation. Dans la moelle osseuse, où les prothymocytes sont en pleine division, ils ne contiennent pas d'IP25. Dans la rate où ces cellules ne se divisent pas, 86 % contiennent de l'IP25. Lorsqu'on provoque la différenciation de ces cellules, on voit au bout de trois heures que l'IP25 est phosphorylée et qu'elle disparaît complètement après 6 heures. C'est alors que les cellules commencent à se diviser et à se différencier. Ces résultats indiquent que la présence de l'IP25 est associée avec un état de non-prolifération des prothymocytes, et que sa disparition accompagne la rentrée des cellules dans le cycle cellulaire. Des résultats semblables mais moins directs ont été obtenus avec les cellules des autres lignées hématopoïétiques : la protéine est seulement présente dans les cellules primitives qui ne se divisent pas. En comparant les cellules de la lignée érythroïde normale de souris avec les cellules FL, on constate qu'il y a un décalage entre les deux systèmes en ce qui concerne l'apparition de l'IP25. Dans les cellules normales, l'IP25 apparaît à des états très primitifs avant l'apparition d'autres marqueurs érythroïdes ; mais dans les cellules FL, elle apparaît en même temps que la spectrine et les enzymes nécessaires à la synthèse de l'hème.

Son apparition dans les cellules FL est accompagnée par un arrêt de la prolifération. L'apparition de l'IP25 dans les cellules FL semble ne pas résulter d'une induction de sa synthèse mais plutôt d'une stabilisation de la protéine.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus indique que l'IP25 joue un rôle dans la régulation de la prolifération des cellules et que sa présence bloque la division.

II. - *GROUPE IMMUNOLOGIE* (Marie-Hélène BUC, Martine DAMONNEVILLE, Philippe DUBOIS, Marc FELLOUS, Gabriel GACHELIN, Rolf KEMLER, Dominique MORELLO, Takashi MURAMATSU).

A. - *Etudes sur les polysaccharides  
de la surface des cellules embryonnaires*

Cette étude comprend deux aspects complémentaires :

- la caractérisation des glycopeptides dérivés de la membrane plasmique ;
- la caractérisation des récepteurs aux lectines de ces différentes cellules.

1) *Caractérisation des glycopeptides dérivés de la membrane plasmique des cellules de CE.* Les cellules de CE incorporent du  $^3\text{H}$ -fucose dans du matériel non dialysable. Les glycopeptides sont préparés par digestion à la Pronase, soit des cellules, soit des membranes purifiées. Deux classes majeures de fucosyl-glycopeptides peuvent être séparées par chromatographie sur Séphadex G50 : une classe de poids moléculaire 2 500 et une classe correspondant à un poids moléculaire de 8-10 000 daltons. Ce dernier matériel n'est pas présent dans les cellules différenciées.

Une analyse biochimique plus poussée des glycopeptides de hauts poids moléculaires montre qu'en plus du fucose, ils contiennent du galactose, de la glucosamine, mais *pas* ou peu de mannose. Ce matériel n'est pas un glycolipide, ni un glycosylaminoglycane. Il n'est pas non plus une substance de type groupe sanguin, non plus qu'un produit de digestion incomplète. Il s'agit, en fait, d'une famille de molécules tout à fait inhabituelle, jusqu'à présent trouvée en quantités notables dans les seules cellules de CE. Bien qu'un matériel voisin ait été trouvé dans les membranes internes des fibroblastes, il semble que la particularité des cellules de CE soit, d'une part l'anormale proportion de ce matériel, et d'autre part le fait qu'il dérive très probablement de la membrane plasmique. En effet, ce matériel copurifie avec les membranes et dérive par digestion à la Pronase, de glycoprotéines

membranaires. Ce matériel disparaît, en qualité et en pourcentage, de la surface des cellules de CE au cours de leur différenciation. Un matériel identique est retrouvé sur les lignées de CE humaines, mais non pas sur d'autres lignées tumorales ou différenciées. Enfin, ce matériel est exprimé normalement sur l'embryon avant implantation. Il disparaît, dans le courant du jour 9 du développement embryonnaire, au moment où les cellules perdent, pour l'essentiel, leur propriété de multipotentialité.

2) *Caractérisation des récepteurs de lectines des cellules de CE.* L'interaction de lectines de spécificités variées avec les cellules de carcinome embryonnaire et de leurs différenciations a été étudiée. Ces travaux ont permis de conclure à la disparition, au cours de la différenciation *in vitro*, des récepteurs à deux lectines, l'une spécifique du fucose, l'autre du galactose (lectines du lotus et de l'arachide respectivement), tandis que les récepteurs à la Con A ou à la WGA restaient exprimés. Les récepteurs ont été purifiés par immunoprécipitation indirecte. Il s'agit de glycoprotéines en nombre d'espèces restreint. Ces récepteurs libèrent des glycopeptides de haut poids moléculaire lors de leur digestion par la Pronase. On peut donc les considérer comme des marqueurs de la présence de ce matériel pour les cellules embryonnaires. Les cellules embryonnaires normales, ainsi que les cellules de CE humaines présentent des propriétés identiques du point de vue des lectines.

3) *Obtention et analyse de sérums dirigés contre les glycopeptides de la cellule F9* (ce travail est fait en collaboration avec R. Girard du service des Antigènes bactériens). Par hyperimmunisation de lapins avec les glycopeptides de haut poids moléculaire de F9, obtenus par traitement à la Pronase, et couplés à l'hémocyanine, on a obtenu un sérum qui, après absorption massive, tue spécifiquement les cellules F9 en présence de complément avec un titre de 1/200°. L'étude détaillée de ce sérum est en cours.

#### B. - *Etudes sur les antigènes F9 de carcinome embryonnaire*

Cette étude comprend également deux aspects complémentaires :

- la définition sérologique du sérum anti-F9,
- la caractérisation immunochimique de certains récepteurs aux anticorps anti-F9.

1) *Composition du sérum hyperimmun syngénique 129/Sv anti-F9.* L'activité cytotoxique de ce sérum est stable après la quatrième immunisation.

L'absorption de l'antisérum sur des cellules de sac vitellin enlève essentiellement des anticorps dirigés contre des composants du sérum de veau fœtal. La quasi-totalité de l'activité cytotoxique du sérum anti-F9 absorbé est associée à des IgM. Une fraction de l'activité n'est décelable que par immunofluorescence et est associée à des IgG<sub>1</sub> (non cytotoxiques). Plusieurs autres immunosérums anti-F9 ont des propriétés identiques. Des traces d'IgG<sub>2a</sub> et d'IgG<sub>2b</sub> anti-F9 sont décelables dans tous les sérums. Par contre, ne se trouve ni IgG<sub>3</sub>, ni IgA anti-F9.

Le sérum d'animaux mâles 129/Sv porteurs de tumeurs de CE (F9-41) a également été analysé. Il contient aussi des IgM et des IgG<sub>1</sub>, actives sur les cellules F9 produites *in vitro*. Par contre, ce sérum n'est que faiblement cytotoxique. Au niveau de la tumeur, on décèle des IgG<sub>1</sub> et des IgM, mais pas d'immunoglobulines des autres sous-classes ou classes. Ces IgG<sub>1</sub> et IgM peuvent être éluées de la surface des cellules tumorales. On peut montrer alors qu'elles sont capables de réagir avec les cellules F9 poussées *in vitro*.

2) *Caractérisation immunochimique de certains récepteurs aux anticorps anti-F9.* On savait depuis 1975 que le sérum anti-F9 reconnaît dans les cellules une protéine de poids moléculaire 42-44 000, associée à une molécule de poids moléculaire 12 000. Dans des études antérieures, on a montré que la chaîne lourde n'avait pas de parenté avec celle des antigènes H-2, et que la chaîne légère n'était pas la  $\beta_2$ -microglobuline.

On a pu vérifier que les Ig anti-F9 réagissent effectivement avec une glycoprotéine de poids moléculaire 40-44 000 daltons, légèrement plus mobile que les antigènes H-2 en SDS-PAG électrophorèse. Après radiomarquage à l'isoleucine, on n'a pas retrouvé de molécule de poids moléculaire apparent 12 000 daltons. C'est sur la structure de la chaîne saccharidique de l'antigène que les efforts ont été concentrés. Cette chaîne contient du fucose, du galactose et de la glucosamine. Par contre, à la différence de celle de H-2, elle ne contient pas de mannose. Enfin, le traitement protéolytique extensif de l'antigène par la Pronase libère un glycopeptide de poids moléculaire 10-12 000 daltons, très différent de celui de H-2 (2 800 daltons). Ce matériel est identique à celui décrit plus haut.

Ce travail avait trait aux récepteurs aux IgG anti-F9. Une tentative de purification des récepteurs aux IgM anti-F9 a également été effectuée. La digestion prolongée à la papaïne permet d'obtenir, à partir de cellules F9, des fragments de poids moléculaire voisin de 3 000 daltons qui conservent les déterminants antigéniques reconnus en cytotoxicité par le sérum anti-F9. Ces fragments sont très fortement enrichis en sucre par rapport aux acides aminés initialement présents, et leur activité inhibitrice de la cytotoxicité peut

être détruite par un traitement ménagé au périodate. Les déterminants reconnus en cytotoxicité par le sérum syngénique anti-F9 semblent donc être de nature glycosidique.

C. - *Recherche systématique de constituants lipidiques caractéristiques du tératocarcinome indifférencié* (travail effectué en collaboration avec M<sup>me</sup> Morelec et M. Dupouey, du service de Biochimie des antigènes)

Dans les cellules de CE PCC3, deux constituants glycolipidiques sont très fortement enrichis par rapport aux cellules différenciées testées : il s'agit d'un ganglioside et d'un glycolipide neutre qui est en cours d'identification. Des immunisations faites contre ces glycolipides purifiés ont débuté récemment.

D. - *Production d'anticorps monoclonaux anti-cellules CE*

Au cours de la différenciation embryonnaire, la caractérisation des structures de surface cellulaire au moyen d'antisérums classiques (syngéniques, allo-géniques et xénogéniques) comporte toujours des difficultés considérables. Même après des absorptions polyvalentes, les antisérums présentent des activités difficilement comparables.

Pour cette raison, on a recouru à une nouvelle méthode décrite par Milstein et collaborateurs. Cette méthode est la suivante : en présence de polyéthylène glycol, on fusionne les cellules d'un myélome sécréteur d'immunoglobulines avec des cellules de rate provenant d'un animal immunisé contre un antigène (x). Parmi les produits de la fusion qui sécrètent en principe l'immunoglobuline du myélome, on trouve de rares ségréants qui fabriquent des anticorps dirigés contre l'antigène (x), d'une très haute spécificité et en très grande quantité. Le grand avantage de cette méthode est que chaque « hybridome » sécrète des anticorps monospécifiques pour un déterminant antigénique.

Suivant cette approche méthodologique, on a fusionné des cellules de myélomes murins (myélomes sécréteurs d'immunoglobulines ou myélomes non sécréteurs) avec des cellules spléniques de souris ou de rats immunisés avec différentes cellules tératocarcinomateuses.

Un premier succès a été obtenu en fusionnant des cellules de myélome avec des splénocytes de rats immunisés contre les cellules de la lignée F9. Dans ce cas, les splénocytes de rats immunisés avec des cellules F9 ont donné, après fusion avec des cellules de myélome, un grand nombre d'hybrides sécrétant des anticorps spécifiques contre la cellule F9. Sur une totalité

de 93 hybrides, 28 se sont révélés positifs contre F9, et parmi ces derniers, cinq ont été, pour le moment, étudiés plus en détail. Chacun de ces cinq hybrides sécrète un anticorps (ECMA = embryonal carcinoma monoclonal antibody) qui décèle un déterminant antigénique différent. Ce résultat a été mis en évidence en éprouvant chaque ECMA sur des cellules de carcinome embryonnaire, sur ses dérivés différenciés, sur des embryons précoces, sur des cellules de la lignée germinale mâle et également sur différents types cellulaires somatiques de la souris. Les premiers résultats obtenus montrent clairement l'avantage qu'offrent les hybridomes pour l'étude des structures de surface cellulaire, et permettent de considérer de façon optimiste les hybrides restants et non encore caractérisés.

Suivant la même technique, la fabrication d'autres hybrides producteurs d'anticorps contre d'autres cellules de carcinomes embryonnaires et les dérivés différenciés de ceux-ci est en cours.

#### E. - *Etude des produits du locus T*

Le locus T de la souris est une région complexe du chromosome 17 qui gouverne certaines étapes du développement embryonnaire. Pour rendre compte des effets multiples produits par certaines mutations du locus T, l'hypothèse a été proposée selon laquelle certains gènes t détermineraient la synthèse d'antigènes de surface impliqués dans des interactions cellulaires spécifiques du développement de l'embryon. Ces antigènes t ont jusqu'ici été caractérisés au moyen de sérum provenant d'animaux de type sauvage immunisés contre des spermatozoïdes provenant d'animaux porteurs d'haplotypes t. Ces sérums sont alors éprouvés sur les spermatozoïdes de même genotype que ceux ayant servi à l'immunisation.

Malheureusement, les spermatozoïdes ne fournissent un bon matériel ni pour l'immunisation, ni comme cellules cibles. On a donc essayé d'obtenir d'autres cellules exprimant un antigène t à leur surface. Cette recherche s'est poursuivie dans deux directions différentes.

1) Production de tératocarcinomes par greffe d'embryons porteurs d'haplotypes t dans des testicules de souris syngéniques. Cette recherche s'est jusqu'ici révélée infructueuse.

2) Production d'hybrides entre cellules CE et thymocytes de souris possédant un haplotype t. On sait en effet que de tels hybrides présentent les propriétés des cellules CE et, en particulier, expriment les mêmes antigènes embryonnaires que les cellules CE. Des hybrides ont été ainsi produits entre cellules de la lignée CE, PCC4, Aza<sup>R</sup>, et des thymocytes provenant de souris hétérozygotes pour un haplotype t, en particulier t<sup>w32</sup>. Les produits de fusion stable ont ainsi été obtenus. Ils expriment l'antigène F9. Ils devraient donc



exprimer aussi l'antigène  $t^{w32}$ . Ces cellules réagissent en effet avec un sérum anti- $t^{w32}$  (obtenu par immunisation de spermatozoïdes). Malheureusement, il semble que cette réaction soit très faible, trop faible pour permettre d'utiliser efficacement ces hybrides comme cellule cible.

### III. — GROUPE EMBRYONS DE SOURIS (Charles BABINET, Hubert CONDAMINE)

#### A. - *Evolution des glycopeptides des cellules embryonnaires au cours des premiers stades de l'embryogenèse*

Une corrélation a été recherchée entre cellules de tératocarcinome et cellules embryonnaires, pour voir si les mêmes types de glycopeptides trouvés dans les premières étaient présents dans les secondes. Un protocole identique à celui décrit dans le cas des cellules de carcinome embryonnaire a été utilisé : marquage de cellules embryonnaires par culture *in vitro* pendant 6 heures en présence de fucose ou de galactose radioactif, lavage, digestion prolongée des cellules à la Pronase, chromatographie du produit de la digestion sur colonne de Sephadex G50. Les stades embryonnaires examinés s'échelonnaient entre le jour 3 (stade morula) et le jour 11 (moment où différentes organogenèses (tube nerveux, ébauche cardiaque, ébauches de membre, etc.) sont en pleine évolution. Des embryons âgés de 5 ou 6 jours n'ont cependant pas été examinés en raison de difficultés techniques propres à ces stades. Les résultats obtenus sont très comparables à ceux obtenus avec le tératocarcinome. La présence, notamment, d'une famille de glycopeptides de haut poids moléculaire (qui caractérisaient les cellules de carcinome indifférenciées) est observée à nouveau dans les cellules embryonnaires précoces, jusque vers le 8<sup>e</sup> jour de l'embryogenèse. A ce stade, on observe le début d'une diminution quantitative de ce matériel qui disparaît à peu près totalement vers le 11<sup>e</sup> jour. Des études sont en cours pour préciser si, comme dans le cas du carcinome embryonnaire, les glycopeptides sont portés par la surface des cellules de l'embryon.

#### B. - *Génétique de l'antigène F9*

On a tenté d'obtenir des données sur un polymorphisme éventuel de l'antigène (s) F9 en poursuivant l'examen systématique de souches inbred de souris chez lesquelles on titre la quantité d'antigène présent sur les spermatozoïdes dans des expériences d'absorption où le sérum absorbé est ensuite titré en cytotoxicité. Bien que des variations quantitatives puissent être observées, allant parfois du simple au double, aucune n'a paru suffisante

pour permettre de suivre, dans des croisements, la ségrégation d'un phénotype « haut » ou « bas ». Toutefois, des hybrides (stériles) entre la souche C57BL/10 et deux souches inbred obtenues à partir de souris sauvages ont une lignée germinale à peu près dépourvue d'antigène F9. Des expériences témoins où l'on examinait l'aptitude du sérum anti-F9 à réagir avec des morulae de la souche C57BL/10 (en immunofluorescence indirecte) semblent indiquer que les morula C57BL/10 ne sont pas marquées par le sérum anti-F9 dans des conditions où toutes les morula d'une souche témoin (129) le sont. Il reste à déterminer si cette propriété peut être corrélée avec une inaptitude des spermatozoïdes de cette souche à absorber l'activité d'un sérum anti-F9, auquel cas le déterminisme génétique de phénomène pourrait être étudié assez facilement.

Du fait qu'un lien semble exister entre les produits du locus T et l'antigène F9, on tente de préciser ce lien en étudiant les propriétés des recombinants pour la région T. Quatre recombinants obtenus au laboratoire à partir de l'haplotype  $t^{w32}$  sont actuellement à l'étude, mais ce travail est rendu très difficile par le caractère très chétif (qui en fait de très mauvais producteurs d'embryons) de la plupart des individus recombinants.

Comme les haplotypes t sont censés gouverner la production d'antigènes de surface particuliers sur les cellules embryonnaires, on essaie également de repérer des modifications de surface chez des embryons homozygotes pour un haplotype t donné de la manière suivante. On cherche si, dans un croisement qui ségrège de tels homozygotes, on peut repérer des embryons dont les cellules sont impuissantes à fixer diverses lectines spécifiques de sucres variés. Jusqu'à présent, deux lectines utilisées, l'une spécifique du fucose, l'autre du galactose, n'ont fait apparaître aucune différence dans un croisement qui ségrège des homozygotes  $t^{w32}$  par rapport à un croisement témoin qui n'en ségrège pas. L'étude est poursuivie avec d'autres lectines et d'autres haplotypes t.

#### C. - *Obtention de souris chimériques par injection de cellules de tératocarcinome dans un blastocyste receveur*

On sait qu'il est possible de « rediriger » la différenciation des cellules malignes de tératocarcinome en les injectant dans la cavité d'un blastocyste, lequel est ensuite réimplanté dans l'utérus d'une femelle convenablement préparée. Dans ces conditions, plusieurs laboratoires ont pu obtenir des animaux dont divers tissus, lignée germinale comprise (mais ce cas est très peu fréquent), provenaient éventuellement de la multiplication et de la différenciation, apparemment normales, des cellules tératocarcinomateuses. On a donc fabriqué, selon cette technique, une centaine de souris en utilisant une souche de carcinome dont le caryotype apparemment dépourvu d'anoma-

lie permet d'espérer qu'il peut éventuellement être réintégré dans la lignée germinale. Ces souris potentiellement chimériques sont actuellement en cours d'analyse et l'on s'efforce de déterminer, par des épreuves génétiques et biochimiques, quels sont ceux de leurs tissus qui ont un composant provenant du tératocarcinome. Une souche de carcinome qui donnerait un pourcentage même bas (quelques pour cent) de chimères germinales serait très intéressante parce qu'elle permettrait d'introduire dans des souris des mutations sélectionnées sur des cultures cellulaires *in vitro*.

#### D. - Sauvetage de mutants létaux du locus T

Le locus T de la souris, porté par le chromosome 17, présente dans les populations naturelles, un haut degré de polymorphisme et l'on peut extraire des souris sauvages des haplotypes aux propriétés très diverses, le plus souvent létaux à l'état homozygote, par blocage du développement embryonnaire à des stades très précoces. Une question non résolue est de savoir si ces effets létaux sont dus à ce que les cellules homozygotes meurent par défaut d'un composant essentiel, ou si, comme l'ont suggéré plusieurs auteurs, un défaut d'interaction entre cellules embryonnaires, dû à des composés membranaires modifiés, doit être tenu pour responsable. Dans ce dernier cas, on pourrait s'attendre à ce que, mises en interaction avec des cellules normales, les cellules homozygotes létales soient éventuellement sauvées. On a essayé de déterminer ce point en fabriquant des chimères (par fusion d'embryons au stade morula) entre embryons normaux et homozygotes t. Le problème est compliqué du fait que les homozygotes t létaux ne peuvent être obtenus qu'à partir de deux parents hétérozygotes dont le croisement produit à la fois des homozygotes létaux recherchés, des hétérozygotes et des homozygotes normaux. Au stade morula, ces différents types ne peuvent être repérés et on a dû mettre au point un système de marqueurs caryologiques et biochimiques pour décider du type d'embryon dont provient une chimie donnée. Plusieurs dizaines de telles chimères sont actuellement analysées et des résultats préliminaires suggèrent que certaines mutations létales du locus T sont en effet susceptibles d'un sauvetage par interaction avec cellules normales.

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

#### A. - Récupération d'embryons létaux *in utero*

On a montré que des cellules d'embryons normalement incapables de se développer pouvaient participer à la formation d'embryons chimères viables. On a obtenu plusieurs chimères C57BL/6  $\longleftrightarrow$  129 dans lesquelles les cellules d'origine C57BL/6 portent une mutation létale.

B. - *Etude de la mutation « repeated epilation » (Er)*

En collaboration avec Berthe Salzgeber du Collège de France et Marie-Thérèse Tassin de l'Ecole dentaire, on a étudié le développement anormal des embryons homozygotes Er/Er. Ces embryons présentent un syndrome de displasie épidermique typique et sont létaux à la naissance. La mutation Er est donc également une mutation de différenciation intéressant l'épiderme.

C. - *Contribution à la connaissance du locus T de la souris*

Le locus T présente un intérêt considérable pour les généticiens de la souris. Il existe, en effet, à ce locus, une très longue série de mutations dominantes et récessives dont l'origine (populations sauvages ou de laboratoire), le mode de transmission et les effets sont autant d'énigmes. Ces mutations, lorsqu'elles sont à l'état homozygote, interfèrent avec le développement normal à tous les stades embryonnaires, se transmettent de génération en génération sans respect des lois mendéliennes classiques et suppriment la recombinaison génétique sur une grande partie du chromosome 17 qui les porte.

Considérées dans leur ensemble, ces mutations correspondent à 6 groupes de complémentation en ce qui concerne la létalité. Ceci veut dire qu'un double hétérozygote pour deux allèles appartenant à des groupes différents vit et se développe à peu près normalement (bien que les mâles soient toujours stériles), tandis que les homozygotes pour un allèle donné appartenant au même groupe de complémentation meurent *in utero* à un stade précis (mais variable selon l'allèle). En collaboration avec Heinz Winking (Medizinische Hochschule de Lübeck, R.F.A.), on a isolé deux nouveaux allèles à partir de populations sauvages (France méridionale et Italie) :

— Le premier allèle ( $t^{WPA}$ ) isolé d'une population sauvage du Lot-et-Garonne est un léthal précoce dont l'étude embryologique est en cours. Il est très probable qu'il s'agit de l'unique représentant actuellement connu d'un nouveau groupe de complémentation, ce qui lui confère un intérêt tout particulier.

— Le second allèle ( $t^{Lub1}$ ) est encore très imparfaitement connu, mais présente la particularité remarquable d'être situé sur un chromosome métacentrique Rb (4-17) 13 Lub, ce qui lui confère de l'intérêt à double titre puisqu'il est léthal et situé sur un chromosome marqueur (les chromosomes de la souris de laboratoire étant normalement acrocentriques). D'autre part, considérant cette situation particulière, nous sommes arrivés à la conclusion que le remaniement chromosomique qui a engendré le chromosome métacentrique Rb (4-17) (qui est toujours un événement rare) est antérieur à l'apparition de la mutation t, faute de quoi ce remaniement aurait été

éliminé de la population sauvage avec la mutation létale. Ceci prouve que les mutations t apparaissent constamment dans la nature bien qu'elles n'aient jamais été observées au laboratoire.

D. - *Découverte de nouvelles mutations chez la souris*

Pendant l'année 1978, on a trouvé sept nouvelles mutations dans l'élevage de souris :

- hpc : hyperspiny purkinje cell (mutation cérébelleuse étudiée en collaboration avec Jean-Pierre Changeux et son groupe)
- m<sup>35</sup> : mutation neurologique récessive caractérisée par des attitudes catatoniques.
- A<sup>w</sup> : coisogénique C57BL/6-H-2<sup>K</sup>
- t<sup>WGJ</sup> : haplotype viable
- m<sup>38</sup> : altération de la couleur du pelage + stérilité récessif
- T22 Pas : translocation réciproque
- T21 Pas : translocation réciproque

PUBLICATIONS

JAKOB H., DUBOIS P., EISEN H. et JACOB F. — Effets de l'hexaméthylène-bisacétamide sur la différenciation de cellules de carcinome embryonnaire. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1978, 286, 109-111.

JACQUET M., AFFARA N.A., ROBERT B., JAKOB H., JACOB F. et GROS F. — Complexity of nuclear and polysomal polyadenylated RNA in a pluripotent embryonal carcinoma cell line. *Biochemistry*, 1978, 17, 69-79.

JACOB F. — Tératocarcinome et différenciation cellulaire. *La Recherche*, 1978, 9 (n° 89), 421-429.

JACOB F. — Mouse teratocarcinoma and mouse embryo. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1978, 201, 249-270.

MURAMATSU T., GACHELIN G., NICOLAS J.F., CONDAMINE H., JAKOB H. et JACOB F. — Carbohydrate structure and cell differentiation : Unique properties of fucosyl-glycopeptides isolated from embryonal carcinoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 2315-2319.

JAKOB H., BUCKINGHAM M.E., COHEN A., DUPONT L., FISZMAN M. et JACOB F. — A skeletal muscle cell line isolated from a mouse teratocarcinoma undergoes apparently normal terminal differentiation *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, 1978, *111*, 403-408.

FELLOUS M., GÜNTHER E., KEMLER R., WIELS J., BERGER R., GUENET J.L., JAKOB H. et JACOB F. — Association of the H-Y male antigen with  $\beta_2$ -microglobulin on human lymphoid and differentiated mouse teratocarcinoma cell lines. *J. Exp. Med.*, 1978, *148*, 58-70.

NICOLAS J.F., JAKOB H. et JACOB F. — Metabolic cooperation between mouse embryonal carcinoma cells and their differentiated derivatives. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, *75*, 3292-3296.

BUC-CARON M.H., CONDAMINE H. et JACOB F. — The presence of F9 antigen on the surface of mouse embryonic cells until day 8 of embryogenesis. *J. Embryol. exp. Morph.*, 1978, *47*, 149-160.

MORELLO D., GACHELIN G., DUBOIS P., TANIGAKI N., PRESSMAN D. et JACOB F. — Absence of reaction of a xenogenic anti-H-2 serum with mouse embryonal carcinoma cells. *Transplantation*, 1978, *26*, 119-125.

PAULIN D., NICOLAS J.F., YANIV M., JACOB F., WEBER K. et OSBORN M. — Actin and tubulin in teratocarcinoma cells. Amount and intracellular organization upon cytodifferentiation. *Develop. Biol.*, 1978, *66*, 488-499.

AVNER P., DOVE W.F., DUBOIS P., GAILLARD J.A., GUENET J.L., JACOB F., JAKOB H. et SHEDLOVSKY A. — The genetics of teratocarcinoma transplantation : tumor formation in allogenic hosts by the embryonal carcinoma cell lines F9 and PCC3. *Immunogenetics*, 1978, *7*, 103-115.

BOCCARA M. et KELLY F. — Etude de la susceptibilité à l'infection par le virus du polyome et SV40 de plusieurs lignées cellulaires de tétatocarcinome. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1978, *129A*, 227-238.

WAGNER H., STARZINSKI-POWITZ A., RÖLLINGHOFF M., GOLSTEIN P. et JAKOB H. — T-cell-mediated cytotoxic immune response to F9 teratocarcinoma cells : cytolytic effector T cells lyse H-2-negative F9 cells and syngeneic spermatogonia. *J. exp. Med.*, 1978, *147*, 251-264.

EISEN H. — Spectrin synthesis and metabolism in normal and leucemic erythroid tissues. *Blood Cells*, 1978, *4*, 177-188.

GUENET J.L. — La parthénogénèse chez les mammifères. *La Recherche*, 1978, *9*, 484-485.

GACHELIN G. — The cell surface antigens of mouse embryonal carcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, *516*, 27-60.

PAPAIOANNOU V.E., GARDNER R.L., MCBURNEY M.W., BABINET C. et EVANS M.J. — Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 1978, 44, 93-104.

BOCCARA M. et KELLY F. — Expression of polyoma virus in heterokaryons between embryonal carcinoma cells and differentiated cells. *Virology*, 1978, 90, 147-150.

SORIANO L. et PAULIN D. — Alkaline deoxyribonuclease activity in mouse teratocarcinoma cells : variation of enzyme levels during differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1978, 83, 406-413.