

## Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Cette année, le cours a été consacré à l'étude des chromosomes X chez les femelles de mammifères. Depuis longtemps déjà, les généticiens ont été intrigués par le fait que, chez la *Drosophile*, on observe un développement semblable tant chez les femelles de constitution 2A:2X que chez les mâles 2A:1X. Un mécanisme de régulation doit donc exister pour lequel H.J. Muller a proposé le nom de « compensation de dose ». Aujourd'hui, on s'accorde en général à penser que cette régulation s'exerce au niveau de la transcription, la compensation permettant à l'X unique du mâle d'être transcrit en quantité équivalente à celle des 2X de la femelle.

Jusqu'à la fin des années 1950, la question de compensation de dose chez les mammifères n'a guère été soulevée, chacun s'accordant tacitement à penser que ce qui était vrai pour la *Drosophile* l'était aussi pour les mammifères. Dans une revue écrite en 1960, C. Stern mettait en évidence toute une série d'anomalies des chromosomes sexuels récemment découvertes chez les femelles de mammifères et établissait le lien entre ces anomalies et les mécanismes de compensation. Coup sur coup, il est montré, en effet, que :

— chez la rate et chez la femme, les 2X ne se comportent pas cytologiquement de la même manière ; l'un se comporte comme un autosome restant allongé pendant l'interphase et la prophase tandis que l'autre prend un aspect très condensé correspondant au corps nucléaire connu sous le nom de « corps de Barr » ;

— la glucose-6 phosphate déshydrogénase (G6PD), déterminée par un gène lié au sexe, est produite en quantité équivalente par les hommes et les femmes ; chez les femmes hétérozygotes pour une déficience de cet enzyme, les cellules sanguines sont réparties en deux populations suivant qu'elles forment ou non de l'enzyme ;

— chez la souris, on connaît des mutations récessives modifiant la couleur du pelage et touchant des gènes du chromosome X ; les femelles hétérozygotes pour de telles mutations ont une fourrure bigarrée ; le même phénomène est observé avec des gènes autosomaux de couleur du pelage lorsque

des translocations réciproques X-autosomes rattachent ces gènes au chromosome X.

L'ensemble de ces observations a été intégré sous forme d'une hypothèse proposée en 1961 par Mary Lyon. Selon cette hypothèse, l'un des chromosomes X, soit paternel, soit maternel serait inactivé au hasard, à une étape précoce du développement embryonnaire. Le chromosome X inactif prendrait alors une forme condensée correspondant au corps de Barr. Une fois que l'inactivation a eu lieu dans une cellule, tous ses descendants gardent le même chromosome X inactivé. Une femelle de mammifère représente donc une mosaïque formée de clones de deux types, selon que le chromosome X actif est d'origine paternelle ou maternelle.

L'inactivation du chromosome X peut être étudiée par des méthodes génétiques et cytologiques.

1) *Les méthodes génétiques* ont d'abord mis en jeu des caractères touchant la couleur du pelage chez la souris, les femelles hétérozygotes pour de tels caractères ayant un aspect tacheté. Des phénotypes ainsi visibles ne peuvent exister que dans le cas où des cellules souches commencent par migrer puis forment des clones dont les cellules restent associées. C'est ce qui a été observé avec des femelles hétérozygotes pour une mutation liée à l'X et affectant l'émail dentaire : on peut, chez ces femelles, noter des rayures caractéristiques sur les dents.

Chez l'homme on connaît maintenant toute une série de marqueurs biochimiques, d'enzymes notamment, dont la synthèse est gouvernée par des gènes liés à l'X : par exemple la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD), l'hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase (HGPRT), l' $\alpha$ -galactosidase ( $\alpha$ -gal), la phosphoglycerate-kinase (PGK), la phosphorylase B-kinase et le récepteur de la dihydrotestostérone. Chez la femme, deux formes A et B de la G6PD sont connues qui possèdent des mobilités électrophorétiques différentes. Les femelles hétérozygotes G6PD A/B produisent les deux formes. En cultivant leurs fibroblastes et en résolvant des clones, on obtient des clones qui produisent soit la forme A, soit la forme B conformément à la prévision tirée de l'hypothèse de Mary Lyon. En revanche, si on examine des tumeurs malignes formées chez de telles femmes, on trouve le plus souvent que toutes les cellules de la tumeur produisent la même forme de l'enzyme, ce qui est un argument très fort en faveur de l'origine clonale des tumeurs malignes.

2) *Les méthodes cytologiques* permettent de repérer le chromosome inactif qui prend un aspect condensé sous la forme d'un corpuscule appelé chromatine sexuelle, ou chromatine X ou encore corps de Barr. Ce

corpuscule est situé en général contre la membrane nucléaire et prend une coloration sombre durant la prophase mitotique. Dans les tissus de certaines espèces, ce corps chromatique est facilement visible et constitue un excellent marqueur. C'est notamment le cas des fibroblastes humains. Chez les individus ayant des chromosomes X surnuméraires, on trouve en général les corps chromatiques en nombre équivalent moins un. Chez la souris, on connaît une série de translocations réciproques entre le X et l'un des autosomes. Les chromosomes X ainsi remaniés sont en général plus grands que les X normaux. Il est ainsi possible de distinguer les deux chez les animaux hétérozygotes pour un tel remaniement.

En outre, la réplication du chromosome X inactivé n'est pas synchronisée avec celle des autres chromosomes. Elle est en général retardée. On peut l'observer en donnant, pendant un temps bref, de la thymidine tritiée aux cultures cellulaires, puis en cultivant ces cellules en excès de thymidine non-radioactive pendant quelques heures. Les autoradiographies pratiquées sur les préparations de chromosomes de ces cellules permettent d'observer ces retards de réplication dans 10 à 50 % des cellules.

La structure chromosomique de la mule permet de réunir les observations faites à l'aide de techniques différentes. La mule possède 63 chromosomes, 32 provenant de la jument et 31 de l'âne. Les deux X peuvent être aisément distingués par la taille et la position du centromère. En outre le cheval et l'âne produisent deux formes distinctes de G6PD qui présentent des mobilités électrophorétiques différentes. On peut donc tout à la fois montrer que dans un clone donné, un seul des deux chromosomes X est actif et produit la G6PD, tandis que l'autre se réplique tardivement. En examinant une série de clones en culture, on observe une corrélation complète entre ces deux propriétés.

On a ensuite discuté une série de questions qui peuvent être posées à propos de l'inactivation du chromosome X.

*L'inactivation est-elle complète ?* Pour répondre à une telle question, il faudrait pouvoir disposer de marqueurs connus disposés tout au long du chromosome. Chez la souris tous les caractères connus sont inactivés. Dans les fragments d'autosomes attachés au X par translocation, on trouve souvent des caractères inactivés mais pas toujours. En particulier, quand deux caractères autosomiaux a et b sont liés à l'X dans l'ordre Xab, on observe soit une inactivation de a et de b, soit de a sans b, jamais de b sans a. Un tel résultat évoque l'idée d'un mécanisme d'inactivation s'étendant progressivement le long du chromosome X.

Chez la femme, les gènes localisés sur le grand bras du X sont inactivés. En revanche, un gène (Xg) localisé sur le petit bras du X et qui détermine

un antigène sur la surface des globules rouges paraît rester actif sur les deux chromosomes X. Toutefois, ce résultat n'est pas encore admis par tous les auteurs.

*L'inactivation est-elle réversible?* Cette question peut difficilement être étudiée *in vivo*. En culture, au contraire, il est possible d'utiliser des moyens de sélection puissants pour rechercher des cas rares de réversion. Dans le cas de cellules hétérozygotes HPRT<sup>+</sup>/HPRT<sup>-</sup> en particulier, il est possible de sélectionner soit les cellules + dans une population —, soit l'inverse. Toute une série d'expériences ont été effectuées avec des cellules humaines hétérozygotes non seulement pour HPRT mais aussi pour d'autres gènes (G6PD et  $\alpha$ -gal). En aucun cas n'a pu être observée de réactivation d'un X inactivé. Dans une expérience seulement, due à R. de Mars, une réactivation locale concernant le marqueur sélectionné, mais pas les autres, a pu être observée avec une efficacité très faible.

*Quand se fait l'inactivation?* Dans les premiers stades du développement des embryons femelles, les deux X paraissent actifs. Cela peut se montrer chez la souris en comparant des activités enzymatiques (G6PD, HPRT, etc.) chez des embryons XX et XO (viabiles et fertiles chez la souris) ou en cherchant la présence d'un X à réplication tardive. Chez les embryons humains hétérozygotes pour la G6PD, on peut également démontrer l'activité des deux X aux stades précoces. Dans tous ces cas, les premiers signes d'un chromosome X inactivé apparaissent soit au moment de l'implantation, soit peu après.

L'expérience la plus démonstrative a été réalisée par Lyon et Gardner qui ont injecté dans des blastocystes des cellules isolées provenant de la masse cellulaire interne d'autres blastocystes. Le système de marqueurs génétiques qui caractérisent le donneur et le receveur est agencé de telle façon que les chimères produites auront un pelage coloré de manière différente suivant que la cellule donneur avait déjà ou non l'un de ses chromosomes X inactivé. Sur 5 chimères obtenues, 4 ont reçu du donneur une cellule produisant deux types de clones : les uns avec le chromosome X paternel actif, les autres avec le chromosome X maternel actif. Dans chacune de ces cellules de masse cellulaire interne qui ont été injectées dans les blastocystes, les deux chromosomes X étaient donc encore actifs.

Dans une souche de cellules de carcinome embryonnaire dérivée d'un tératocarcinome femelle, G. Martin a trouvé les deux chromosomes X actifs. Ces cellules produisent en effet deux fois plus d'enzymes (G6PD, HPRT et  $\alpha$ -gal) que des cellules semblables mais XO. Toutefois quand ces cellules XX se différencient *in vitro*, le niveau des enzymes produits redescend à celui des cellules XO. Cette baisse est attribuée à l'inactivation d'un X survenant très tôt au cours de la différenciation.

Enfin, récemment, on est parvenu à doser certains enzymes (HPRT,  $\alpha$ -gal, etc.) sur un seul embryon. On trouve ainsi qu'au stade morula, la moitié des embryons (considérés comme femelles) font deux fois plus d'enzyme que ceux de l'autre moitié (considérés comme mâles). En séparant les deux blastomères du stade 2 et en laissant se développer chaque blastomère *in vitro*, on obtient des paires d'embryons sur lesquels on peut faire d'un côté le dosage d'activité enzymatique et de l'autre un caryotype. Epstein et ses collaborateurs ont ainsi montré que ce sont bien les embryons femelles qui font deux fois plus d'enzymes que les mâles. Cette différence disparaît progressivement à partir du stade blastocyste, ce qui est attribué à l'inactivation d'un chromosome X.

*Est-ce que l'inactivation survient véritablement au hasard?* Dans la plupart des mammifères, l'inactivation du X semble se faire au hasard dans les tissus de l'embryon proprement dit. La plupart des anomalies rencontrées semblent pouvoir être attribuées à des phénomènes de sélection survenant dans des populations de cellules. C'est ce qu'on observe chez la mule notamment et aussi chez les souris portant une translocation réciproque X-autosome. Cependant, chez les marsupiaux, il semble bien établi que l'inactivation ne se fait pas au hasard, mais concerne toujours le X paternel, laissant le maternel actif. Récemment, on a montré chez la souris et le rat que, si l'inactivation se fait au hasard dans les tissus de l'embryon proprement dit, il n'en est pas de même pour le trophoblaste et l'endoderme primitif où c'est toujours le X paternel qui paraît inactivé.

*Que se passe-t-il pendant la gamétogenèse?* Chez l'ovocyte de femme ou de souris, on peut montrer, par des méthodes biochimiques ou cytologiques, que les deux X sont fonctionnels. Il faut donc admettre ou bien qu'un des X est inactivé au début de la formation de la lignée germinale pour être réactivé plus tard ; ou bien que dans la lignée germinale femelle les deux X restent toujours actifs. Des fœtus humains ont été étudiés à cet égard. Dans les ovaires, on trouve une bande hybride, démontrant l'expression des deux X, après mais seulement après la méiose.

Chez la souris, l'étude des souris XO montre un grand nombre d'anomalies. Une fraction des descendants de ces souris meurent très vite pendant le clivage : ils correspondent aux individus YO. Mais la très grande majorité des autres est retardée et présente souvent des anomalies de développement. Ces anomalies ont été attribuées à une quantité insuffisante des produits formés par un seul, et non pas deux chromosomes X. Dans la lignée germinale mâle, il existe une série d'arguments tant génétiques que cytologiques pour montrer qu'au stade critique de la spermatogenèse, les chromosomes X et Y se condensent, se répliquent tardivement et sont inactivés.

*Quel est le mécanisme de l'inactivation du chromosome X ?* Ce mécanisme est encore inconnu. Une série de modèles ont été proposés par divers auteurs. Ces modèles ont été discutés en détail.

F. J.

#### SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires sur les relations entre virus et différenciation cellulaire.

M. Daniel BLANGY, Professeur à l'Université de Paris VII, a décrit la régulation de l'expression virale dans les cellules de carcinome embryonnaire murin.

M. Marc FISZMAN, Chargé de recherche à l'I.N.S.E.R.M., a donné un séminaire sur l'interaction entre transformation virale et expression du programme spécifique des cellules musculaires en culture.

M. Harvey EISEN, Maître de recherches au C.N.R.S., a fait un exposé sur les cellules de Friend et la différenciation de la lignée érythropoïétique.

M. Hubert CONDAMINE, Sous-Directeur de laboratoire au Collège de France, a rassemblé en deux exposés les données récentes concernant la leucémogénèse chez la Souris AKR.

M. Jacques TEMPÉ, Maître de recherches à l'I.N.R.A., a exposé ses expériences sur le rôle de la fonction catabolique du plasmide oncogène d'*Agrobacterium tumefaciens*.

M. Jorge PERIES, Directeur de recherches au C.N.R.S., a traité des interrelations entre virus et cellules du carcinome embryonnaire.

M. Gérard ORTH, Maître de recherches au C.N.R.S., a donné un séminaire sur l'interaction papilloma virus-kératinocytes, modèle d'étude de la cancérogénèse virale dans les conditions naturelles.

M. Pierre SCHAEFFER, Professeur à l'Université Paris XI, Centre d'Orsay, a rendu compte de la non expression d'un chromosome dans des bactéries rendues diploïdes par fusion.

M. Marcello SINISCALCO, Professeur de biologie au « Memorial Sloan Kettering Center » à New York a discuté deux exceptions prétendues à l'inactivation du chromosome X chez l'homme (« Two alleged exceptions to the X-inactivation in Man »).

M. Dominique STEHELIN, Maître de recherches au C.N.R.S., a décrit trois nouveaux types d'oncogènes viraux d'origine cellulaire spécifiques pour la transformation de cellules hématopoïétiques.

#### ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Au cours de l'année scolaire, l'étude de la différenciation cellulaire s'est poursuivie dans le laboratoire situé à l'Institut Pasteur. Ainsi qu'il a été précisé dans les précédents rapports, cette étude met en jeu deux matériels : le tératocarcinome de la souris et les embryons de souris aux stades précoces de leur développement. C'est 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 recherches 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, Jay LEVY, Jean-François NICOLAS, Anna STARZINSKI-POWITZ).

##### A. - *Lignées de carcinome embryonnaire*

Une nouvelle lignée de carcinome embryonnaire (CE), désignée PCC8, a été isolée à partir d'un tératome spontané. Ce dernier est apparu dans le testicule d'une souris de génotype T/t<sup>w18</sup>. La lignée, isolée sur une couche nourricière de fibroblastes irradiés est « multipotentielle » ; injectée dans des souris syngéniques, elle produit des tumeurs contenant des dérivés des trois feuillettes. De plus, ces cellules PCC8 sont capables de se différencier *in vitro* en produisant de l'endoderme comme premier type de cellules différenciées. A notre connaissance, ce sont le premier tératocarcinome et la première lignée de carcinome embryonnaire isolés qui contiennent des haplotypes t dans leur génotype. Les propriétés de ces cellules sont à l'étude et, en particulier, leur capacité d'association avec d'autres lignées CE ainsi que les types de structures antigéniques présentes à leur surface.

En même temps s'est poursuivie l'étude des lignées à potentialités dites « restreintes ». Ces lignées issues de la souris C3H semblent donner principalement, sinon exclusivement, des différenciations de type nerveux,

alors que la lignée de carcinome embryonnaire à partir de laquelle elles ont été obtenues produisait des dérivés des trois feuilletts embryonnaires. La différenciation de ces cellules est étudiée à Paris aussi bien qu'à La Jolla où Michel Darmon effectue un stage dans le laboratoire de Gordon Sato.

#### B. - *Coopération métabolique entre cellules CE et autres cellules*

On a montré l'année précédente que les différentes lignées de cellules CE étaient capables d'effectuer des coopérations métaboliques entre elles mais non avec des cellules différenciées. En utilisant diverses lignées CE, on trouve des efficacités de coopération différentes. On peut, par ce moyen, distinguer trois catégories de cellules CE. Ces catégories correspondent vraisemblablement à des stades différents auxquelles sont arrêtées ces cellules multipotentielles.

Cette coopération métabolique entre cellules CE est accompagnée par la formation de « gap » et de « tight junctions », comme l'a montré l'étude au microscope électronique en transmission et en cryodécoupage effectuée en collaboration avec L. Benedetti et son équipe à l'Institut de Biologie Moléculaire du quai Saint-Bernard.

La coopération métabolique entre cellules CE est inhibée par les fragments monovalents Fab d'immunoglobulines provenant de lapins immunisés avec les cellules F9. Sous l'effet de ces fragments Fab, les cellules CE adhèrent moins étroitement les unes aux autres. Elles s'arrondissent et l'on retrouve souvent les « gap junctions » dans le cytoplasme cellulaire.

La technique de « lyse métabolique » en présence de thioguanine a été étudiée en détail et comparée à celle de la coopération métabolique. Cette lyse est mesurée par la libération de radioactivité préalablement incorporée dans des cellules déficientes en HGPRT (hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase). Ces cellules sont résistantes à la thioguanine alors que les cellules HGPRT<sup>+</sup> se lysent en présence de cet analogue. La lyse de cellules HGPRT<sup>-</sup> marquées, en présence de cellules HGPRT<sup>+</sup> mesure la « lyse métabolique ». Celle-ci est en tous points comparable à la coopération métabolique. L'intérêt de la lyse métabolique en présence de thioguanine est de permettre la sélection de variants devenus incapables d'établir une coopération métabolique avec d'autres cellules. L'isolement de tels variants est en cours. On a également étudié la « coopération ionique » chez les cellules CE. En présence de ouabaïne, les cellules sensibles sont protégées si elles établissent des contacts avec des cellules résistantes. D'après les premiers résultats, l'efficacité de cette coopération ionique semble supérieure à celle de la coopération métabolique.

C. - *Induction de la différenciation des cellules CE par certains composés*

Certains composés comme l'hexaméthylène-bisacétamide (HMBA) ou l'acide rétinolique déclenchent la différenciation chez certaines lignées de cellules CE. L'effet de ces composés sur une série de cellules CE a été étudié. Presque toutes les lignées se comportent de façon différente quant aux concentrations efficaces et aux types de cellules différenciées produites. On s'efforce maintenant de caractériser certaines propriétés des cellules différenciées obtenues. En collaboration avec D. Paulin, on s'efforce de préciser la structure du « cytosquelette » à l'aide de divers antisérums et de repérer certaines différences dans les protéines produites avant et après traitement de chaque lignée par l'un de ces composés.

D. - *Tentatives pour transformer des cellules CE avec du DNA extrait d'autres cellules*

En collaboration avec A. Worcel, on a entrepris des études visant à transformer des cellules CE à l'aide de DNA total par la technique de Wigler et Axel. Les cellules réceptrices provenaient de la lignée CE, PCC4 Aza<sup>R</sup><sub>1</sub> qui est HGPRT<sup>-</sup>. Comme cellules donatrices HGPRT<sup>+</sup>, on a utilisé des lignées de souris ou humaines. On a tenté quelques expériences de cotransfert de DNA provenant de cellules HGPRT<sup>+</sup> et de DNA purifié de virus SV40 à l'aide du vecteur PBR 322. Les cellules HPRT<sup>+</sup> ont été sélectionnées en milieu HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine). Seules de très rares colonies sont apparues. Toutes ces colonies segrègent avec des fréquences variables, mais parfois élevées, des cellules HGPRT<sup>-</sup>. En analysant le DNA par la technique dite du « blotting » (dans le laboratoire de F. Cuzin), il n'a pas été possible de mettre en évidence les séquences de DNA viral. Toutefois, ces colonies présentent une faible réaction positive en immunofluorescence avec du sérum réagissant avec l'antigène T. L'une des colonies transformée avec du DNA de cellules HeLa présente, à l'analyse électrophorétique de l'enzyme HGPRT, une mobilité qui ne correspond à celles ni de l'enzyme humain, ni de l'enzyme de souris. Peut-être s'agit-il d'un enzyme hybride réunissant des sous-unités humaines et des sous-unités inactives de souris formées par la lignée PCC4 Aza<sup>R</sup>. Reste donc à analyser cet enzyme à l'aide d'antisérums spécifiques dirigés contre l'une ou l'autre forme de l'enzyme.

D'autres expériences ont été entreprises pour transformer avec du DNA contenant un gène de l'HGPRT provenant d'une bactérie et des fragments du virus du polyome.

E. - *Etude d'une lignée différenciée ostéogénique*

Au cours de la différenciation des cellules de tératocarcinome embryonnaire *in vitro*, on peut isoler des types cellulaires provenant des trois feuilletts embryonnaires. Un des clones ainsi obtenus après différenciation de la lignée PCC3/A/1 *in vitro* a été caractérisé comme cellule mésenchymateuse avec des propriétés ostéogéniques, non seulement du point de vue histologique mais aussi du point de vue de son fonctionnement.

En injectant ces cellules 3/A/1-D-1 dans une souris syngénique (129/SV), on peut obtenir la formation de fibrosarcome, d'ostéosarcome et plus particulièrement d'os « normal ». Cet os peut être peuplé avec de la moëlle de l'hôte. A partir d'un os obtenu après injection de 3/A/1-D-1, on a isolé une autre lignée ; ces cellules désignées, 3/A/1-D-1-M, ont perdu le caractère malin. Lorsqu'on les réinjecte dans les souris 129/SV, elles sont uniquement capables de former de l'os et non plus des tumeurs osseuses. Ce système cellulaire peut servir de modèle pour l'étude de la différenciation de l'os et du développement de ses dérivés tumoraux.

La première question que l'on s'est posée concernait l'existence d'une structure membranaire caractéristique des cellules 3/A/1-D-1-M et sa présence éventuelle sur les tissus osseux normaux. Pour répondre à cette question, on a produit des anticorps monoclonaux en utilisant la technique d'hybridation. Plus particulièrement, on a immunisé des souris BALB/C contre les cellules 3/A/1-D-1-M et ensuite on a fusionné les splénocytes de ces souris avec les cellules du myélome Sp20. On a trouvé plusieurs hybridomes sécrétant des anticorps dirigés contre 3/A/1-D-1-M. On a choisi un des anticorps trouvés, SBMA 1, qui avait l'air le plus intéressant pour une caractérisation plus détaillée. SBMA 1 est une immunoglobuline de la classe IgG3. Au cours de la caractérisation de l'antigène reconnu par SBMA 1, on a trouvé les résultats suivants :

1) L'antigène décelé par SBMA 1 est exprimé uniquement sur les lignées cellulaires de la famille de 3/A/1-D-1-M et exceptionnellement sur les cellules 3/A/1-D-3, un fibroblaste embryonnaire.

2) L'expression de l'antigène de SBMA 1 *in vivo* a été recherchée. Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de le trouver sur les cellules de l'os embryonnaire (jours 8 et 10 de gestation et nouveau-né). Par contre, il a été trouvé sur les cellules radiorésistantes de la moëlle adulte.

3) Il est sûr que l'antigène reconnu par SBMA 1 n'est pas un allo-antigène de 129/Sv reconnu par Balb/c. En effet, ces deux souches possèdent l'antigène en commun.

4) On a montré que la structure marquée par SBMA 1 est probablement capable d'activer le système du complément, en particulier la « voie alterne ».

5) Les cellules 3T3 ne réagissent pas avec l'anticorps monoclonal SBMA 1. Si on les infecte avec certains virus de type C (FBJ, FBR, AKR-MuLV), l'antigène en question est réexprimé. Par contre, d'autres virus du type C et le virus à ADN SV40 ne sont pas capables d'induire l'expression de cette structure. Apparemment, les virus FBJ et FBR ne réussissent pas dans tous les types cellulaires à réexprimer l'antigène reconnu par SBMA 1.

#### F. - *Etude sur les protéines de chromatine et leur rôle dans la différenciation cellulaire*

Pendant la différenciation des cellules érythroleucémiques de souris (cellules FL), la protéine IP25 de poids moléculaire de 25 000 daltons s'accumule dans le noyau pendant les premières 24 heures de l'induction. On peut identifier l'IP25 dans d'autres systèmes de différenciation *in vitro* tels que le neuroblastome de souris, les leucémies myéloïdes qui se différencient en granulocytes et macrophages et le phéochromocytome de rat. Dans tous ces systèmes où la différenciation peut être induite, soit par l'hormone normale (N.G.F., C.S.F.), soit par des produits chimiques, l'IP25 apparaît dans la chromatine des cellules très tôt, c'est-à-dire avant tout autre marqueur de différenciation. Nous avons également montré que l'on peut induire l'accumulation de l'IP25 dans la plupart des cellules en culture par l'addition de l'acide butyrique et que cette induction est souvent accompagnée par l'apparition des caractéristiques différenciées des cellules.

##### 1) *Propriétés chimiques*

L'IP25 possède plusieurs propriétés en commun avec l'histone H1. Elle est extraite de la chromatine à la même force ionique que H1 et elle a une charge nette et une taille qui sont voisines de celles de H1. Néanmoins la composition en acides aminés, la structure antigénique et moléculaire de l'IP25 la distingue des H1. L'IP25 contient un résidu de méthionine tandis que les H1 n'en ont pas.

##### 2) *Interactions avec le DNA et la chromatine*

L'IP25 a été localisée dans la chromatine. Elle n'est pas située dans le nucléosome propre mais entre les nucléosomes (comme H1). L'IP25 semble être localisée, spécifiquement, dans les régions de la chromatine non actives et condensées. Grâce au fait que l'IP25 semble protéger le DNA de la chromatine contre la lyse par la nucléase de staphylocoque, on peut isoler les régions riches en cette protéine. Finalement, par les techniques d'immunofluorescence, on peut localiser des régions de la chromatine qui sont riches en IP25. Cette analyse montre une distribution de l'IP25 en

bandes. *In vitro*, l'IP25 interagit avec le DNA. Elle protège le DNA contre la dénaturation thermique et aussi contre l'action de certains enzymes. Elle est aussi capable de précipiter le DNA *in vitro*. Ces propriétés suggèrent fortement que l'IP25 effectue des liaisons sur le DNA.

### 3) *La distribution de l'IP25 in vivo*

Pour étudier la distribution de l'IP25 *in vivo*, on a purifié la protéine et fait des anticorps spécifiques dans le lapin. Ensuite, la distribution de l'IP25 dans des sections congelées des tissus de souris et de rat a été analysée par immunofluorescence. Cela a été fait chez l'adulte (6 semaines) et l'embryon (15 jours). Ces résultats indiquent une distribution intéressante de l'IP25 dans les tissus de la souris. La protéine est présente dans certains tissus solides mais pas dans toutes les cellules terminales, alors que dans les tissus dont les cellules se renouvellent, l'IP25 apparaît dans les cellules qui s'engagent dans la différenciation terminale. C'est le cas dans : la peau, le cristallin, le prothymocyte, etc. Dans la lignée érythroïde, on a montré que l'IP25 apparaît dans la première cellule sensible à l'érythropoïétine et qu'après stimulation, qui déclenche la différenciation terminale, la protéine disparaît.

Un des rôles possibles de l'IP25 est indiqué par le fait que sa présence dans certains tissus solides semble dépendre de la présence continue de l'hormone de maintien. Cela est manifeste lorsqu'on enlève l'hormone de maintien (demi-vie de 24 heures) et qu'on la réinduit par injection de l'hormone. L'apparition de l'IP25 dans la rétine semble exiger la lumière. La protéine n'apparaît que lorsque les nouveaux-nés ouvrent les yeux, bien que la rétine soit différenciée depuis très longtemps. En plus, elle n'apparaît pas dans les rétines des animaux gardés à l'abri de la lumière. Dans le muscle strié, la présence de l'IP25 semble dépendre de l'état d'innervation des cellules.

Les propriétés chimiques ainsi que la distribution *in vivo* de l'IP25 conduisent à proposer le modèle suivant pour son rôle dans le développement. Dans les tissus solides, l'IP25 apparaît toujours en fin de différenciation et, quand cela peut être étudié, en réponse à l'hormone qui maintient l'état différencié. Dans ces cas, l'IP25 jouerait un rôle de stabilisation de l'état différencié des cellules en « compactant » et inactivant la chromatine qui n'est pas nécessaire pour les fonctions spécifiques des cellules.

Dans les tissus en renouvellement, l'IP25 apparaît au moment où est prise la décision d'entrer dans la différenciation terminale des cellules. Dans ces cas, la présence de l'IP25 serait importante pour que les cellules puissent changer de programmes génétiques, c'est-à-dire passer d'un programme proliférateur au programme de différenciation terminale.

II. - *GROUPE IMMUNOLOGIE* (Marie-Hélène BUC, Philippe DUBOIS, Marc FELLOUS, Gabriel GACHELIN, François HYAFIL, Rolf KEMLER, Dominique MORELLO).

A. - *Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface de cellules CE*

Au cours de l'année précédente avait été mise en route une campagne visant à obtenir des « hybridomes » produisant des anticorps monoclonaux contre les structures de surface des cellules CE. La technique de Milstein avait été ainsi utilisée en fusionnant des cellules de myélomes murins (secrétateurs ou non d'immunoglobulines) avec des cellules spléniques de souris ou de rats immunisés avec des cellules provenant de certaines lignées CE. Les propriétés d'une première série d'anticorps monoclonaux, leur distribution sur divers types de cellules et sur l'embryon, ont ainsi été décrites l'année dernière.

Au cours de l'année écoulée, la recherche d'anticorps monoclonaux a été poursuivie en utilisant comme immunogène différentes lignées CE. Parmi les hybridomes ainsi obtenus, certains ont été étudiés plus en détail. Un anticorps monoclonal nommé ECMA 7 (Embryonal Carcinoma Monoclonal Antibody), provenant d'un hybridome fait contre la cellule CE PCC4 reconnaît une structure cellulaire qui présente une distribution très particulière. Cette structure ne se trouve que sur les cellules CE. Par contre, elle est absente des cellules différenciées de carcinome embryonnaire, des cellules de la lignée germinale et des cellules des tissus adultes. Sur des lignées de cellules CE capables de différencier *in vitro*, l'antigène disparaît pendant la différenciation. On peut observer le même effet si on traite des cellules non différenciées avec des composés induisant la différenciation (HMBA, acide rétinoïque). Au cours du développement embryonnaire, l'antigène décelé par ECMA 7 commence à être exprimé sur l'embryon au stade morule (8 cellules). Cette expression persiste uniquement sur les cellules d'ectoderme embryonnaire des embryons au jour 9. ECMA 7 ne réagit pas avec les cellules de foie fœtal, de cerveau d'embryon au jour 14, ni avec les cellules testiculaires d'un nouveau-né. Les résultats des tests sérologiques permettant de caractériser cet antigène ECMA 7 montrent que cette structure pourrait être un marqueur cellulaire des cellules pluripotentes de tératocarcinome et de l'embryon. On a essayé de vérifier cette hypothèse en utilisant le séparateur de cellules (FACS). Sur quelques-unes des lignées de tératocarcinome non différencié, ECMA 7 réagit seulement avec une sous-population de cellules. On a injecté séparément dans des souris les sous-populations positives et négatives afin de voir si la fraction positive seule produit une tumeur contenant des cellules dérivées des trois feuilletts germinaux.

L'un des aspects le plus décevant de ce travail avec des anticorps monoclonaux correspond aux tentatives pour caractériser biochimiquement les antigènes cibles de ces divers anticorps. En aucun cas encore il n'a été possible de purifier l'un de ces antigènes par immunoprécipitation.

## B. - Etudes sur les antigènes F9

### a) Hétérogénéité du sérum syngénique anti-F9

L'année précédente, on avait trouvé que l'essentiel de la cytotoxicité de ce sérum était associé à des IgM, mais qu'une fraction importante de la réactivité anti-F9 était associée à des IgG1 et IgG2<sub>a, b</sub> non ou faiblement cytotoxiques. Depuis lors, on a préparé des échantillons purifiés d'IgM, d'IgG1, d'IgG2<sub>a, b</sub>, exempts de contaminations réciproques et encore actives sur les cellules F9. Les résultats obtenus avec ces préparations purifiées ont confirmé les études antérieures réalisées sur un sérum total.

### b) Hétérogénéité cellulaire des sites antigéniques F9

Disposant de ces préparations purifiées, on a repris l'analyse systématique des différentes lignées de cellules F9<sup>+</sup> en utilisant cette fois des composants isolés de l'antisérum. Toutes les cellules CE expriment des récepteurs aux IgM. Aucune cellule différenciée n'exprime de tels récepteurs. En ce qui concerne les récepteurs aux IgG1 et IgG2, la situation est très différente : une majorité de cellules CE n'en expriment aucune ; par contre, deux lignées de cellules CE (F9 et NG2) en expriment des quantités importantes et comparables. Enfin, des récepteurs aux IgG1 se trouvent exprimés, bien qu'en faible quantité, sur une majorité de types différenciés tumoraux. Chez l'embryon, les récepteurs aux IgM sont décelables avant fécondation. Ils augmentent en quantité jusqu'au stade morula, puis décroissent sur les cellules trophoctodermiques. Ils sont bien exprimés sur les cellules de la masse cellulaire interne. Les récepteurs aux IgG2<sub>a</sub> sont décelables au stade 4/8 cellules, et disparaissent des morulae tardives. Les récepteurs aux IgG1 ne sont jamais décelables.

### c) Structure des antigènes F9

Les antigènes F9 ( $\mu$ ,  $\gamma_1$  et  $\gamma_{2a}$ ) peuvent être précipités indépendamment et se comportent comme des molécules indépendantes. Leur migration électrophorétique est cependant semblable. Aucune ne semble être riche en partie protéique. Tous contiennent des proportions importantes de polysaccharides, dont le poids moléculaire de chaîne unitaire est de l'ordre de 7 000 daltons. Dans le cas particulier des F9 ( $\mu$ ), les chaînes polysaccharidiques repré-

sentent jusqu'à 15 % du galactose total incorporé par les cellules F9 en culture.

C. - *Etudes sur les glycopeptides des cellules CE*

a) Au cours des années précédentes avait été mise en évidence la présence de glycopeptides très particuliers sur les cellules CE et les cellules d'embryon précoce. Leur analyse a été poursuivie en collaboration avec le laboratoire de T. Muramatsu à l'Université de Kobe. Ces glycopeptides sont caractérisés par un poids moléculaire dépassant 7 000 daltons. Pour 1 AspNH<sub>2</sub>, chaque chaîne contient 19 Gal, 4 mann, 3 Fuc, 9 GlcN, 2 GalN et 1 Sialic acid. Ces molécules ne sont ni des glycopeptides de type mucine, ni des glycolipides, ni des mucopolysaccharides acides, ni des produits de digestion incomplète à la Pronase. Ils contiennent la séquence centrale GlcNAc β 1 → 3 Gal et sont donc proches des érythroglycanes.

b) Ce matériel provient de structures liées à la membrane plasmatique. D'une part, ces glycopeptides copurifient avec elle, et d'autre part, ils peuvent être marqués de l'extérieur sur les cellules vivantes par la technique de la galactose oxydase/Na B<sup>3</sup>H<sub>4</sub>.

c) Un certain nombre de marqueurs de surface des cellules de CE : les antigènes F9, les récepteurs aux lectines FBP et PNA (mais non ceux à la conA), possèdent des chaînes polysaccharidiques de haut poids moléculaire et de structure identique à celle rapportée en a).

d) Une grande partie du mannose est incorporé dans des molécules pré-curseurs du type « high-mannose ».

D. - *Analyse des constituants lipidiques chez les cellules CE et les cellules différenciées.*

L'analyse des lipides et glycolipides constitutifs de lignées primitives et différenciées du tératocarcinome a été effectuée en vue de déterminer s'il existe une corrélation entre un état de différenciation donné et une distribution spécifique des lipides de la cellule. Ce travail a été effectué en collaboration avec M<sup>m</sup>e J. Morelec, de l'Unité de Biochimie des antigènes. Deux approches complémentaires ont été utilisées : analyse biochimique (extraction des lipides totaux, partition entre lipides plus ou moins apolaires par la méthode de Folch, puis séparation entre les glycolipides acides ou non sur colonne de DEAE, enfin chromatographie sur couche mince de silice), et analyse immunologique (injection d'un ganglioside purifié au lapin, purification par affinité des anticorps préalablement débarrassés de

leurs éventuelles réactivités croisées et test par immunofluorescence indirecte sur les diverses lignées en culture).

Par ces deux méthodes, on a pu montrer qu'il existe des différences significatives dans la distribution des phospholipides, du cholestérol, et surtout des glycolipides acides (gangliosides), selon l'état de différenciation. Des gangliosides à chaîne osidique courte ( $GM_3$  et  $GD_3$ ) caractérisent les cellules indifférenciées multipotentielles (PCC3, PCC4 Aza,  $NG_2$ ), cependant que des gangliosides à chaîne osidique plus longue apparaissent très tôt au cours de la différenciation (PCC3 au 6<sup>e</sup> jour de différenciation, trophoblastome, endoderme dérivé *in vitro* de  $NG_2$ ). Chaque lignée différenciée présente une distribution particulière de gangliosides.

Des expériences en cours, effectuées en collaboration avec J.P. Cartron et son groupe au Centre National de la Transfusion Sanguine, montrent que la glycosyl-transférase spécifique qui allonge la chaîne osidique de  $GM_3$  en ses homologues supérieurs, est bien exprimée dans la cellule d'endoderme PYS-2, mais n'est pas décelable dans la lignée primitive PCC3. Cette enzyme pourrait donc être un marqueur de différenciation très précoce.

Des études immunologiques sur l'embryon de souris sont en cours.

#### E. - Structures d'agrégation des cellules CE

Comme on l'a déjà souligné, l'agrégation des cellules CE et des cellules de morula inhibée par des fragments monovalents Fab d'IgG provenant de lapins immunisés contre les cellules F9. Il doit donc exister à la surface des cellules CE une structure à laquelle se combinent les fragments Fab. En outre, il a été trouvé que les cellules CE relâchaient dans le milieu de culture une substance favorisant l'agrégation des cellules CE.

##### 1) Structure membranaire se combinant aux fragments Fab anti-F9

On a tout d'abord cherché à identifier et purifier la ou les structures membranaires qui réagissent avec les Fab de lapin anti-F9. L'approche utilisée a été l'absorption (par des cellules ou des membranes) ou l'inhibition (par des extraits solubles) de l'action des Fab sur les cellules CE PCC4 Aza. Une fraction membranaire, obtenue par centrifugations différentielles de cellules PCC4 Aza cassées par lyse hypotonique, est capable d'absorber spécifiquement l'action des Fab.

a) *Solubilisation par les détergents.* Le test sur PCC4 Aza a été mis au point en présence de faibles concentrations du détergent non ionique Berol en utilisant une grande quantité de BSA pour « pomper » le détergent

et empêcher la lyse des cellules. Cette faible concentration de Berol ne suffit pas à solubiliser les molécules membranaires. Les membranes ont donc été solubilisées par un grand excès de cholate, puis le cholate échangé contre le Berol par filtration sur Séphadex G50. Dans ces conditions, une activité inhibitrice des Fab peut être solubilisée. Cette activité est résistante à la trypsine et à la chymotrypsine. Lorsque des membranes sont traitées au chloroforme/méthanol, une activité inhibitrice des Fab peut être récupérée par digestion trypsique du culot de glycoprotéines.

b) *Extraction à la trypsine.* Les soupçons se sont donc portés sur une glycoprotéine de membrane résistante à la trypsine. Le récepteur au Fab a donc été purifié à partir de membranes solubilisées au cholate puis digérées à la trypsine, et plus tard à partir de membranes digérées directement à la trypsine. Ce traitement permet la solubilisation quantitative du récepteur aux Fab et permet de se débarrasser d'un grand nombre de glycoprotéines résistantes à la trypsine et non extractibles par cette dernière. Le protocole : purification des membranes, extraction à la trypsine, filtration sur gel de Biogel A 1,5 m (l'activité migre à un PM apparent d'environ 100 000) et chromatographie sur ConA-sepharose avec élution avec l' $\alpha$ -méthyl-mannoside permet de purifier environ 20 000 fois l'activité avec un rendement de 20 à 30 %. La fraction ainsi purifiée est dépourvue d'activité protéolytique sur les Fab. De plus, si elle est traitée par les IgG de lapin anti-F9 puis par *Staphylococcus aureus*, l'activité inhibitrice est précipitée. Si le protocole de purification est appliqué à des cellules marquées à la méthionine S<sup>35</sup>, l'électrophorèse en SDS montre une bande majeure à 84 000 daltons et quelques bandes mineures. Seule la bande à 84 K est immunoprécipitée par le IgG anti-F9 ou les IgG absorbées sur 1144. Par contre, après absorption sur Pys, trophoblastome et PCC3, trois lignées qui absorbent l'activité des fragments Fab, les IgG anti-F9 ne précipitent plus la bande à 84 K. Cette glycoprotéine (Gp 84) acide (pI  $\sim$  4,5) en urée) contenant du Gal, du Fuc, du Man, du GlcNH<sub>2</sub> est donc un bon candidat pour être le récepteur aux Fab. Le sérum employé étant polyspécifique, on peut toutefois opposer l'idée que Gp 84 est une impureté co-purifiant avec le véritable récepteur aux Fab. La preuve irréfutable de l'identité entre Gp 84 et le récepteur aux Fab serait l'obtention d'un anticorps monoclonal contre Gp 84 ayant un effet décompactant. Une preuve raisonnable sera de démontrer que Gp 84 et l'activité inhibitrice des Fab co-migrent sur gel de SDS. La mise au point d'un dosage radio-immunologique de Gp 84 ne s'est pas avérée possible à cause :

1) de la perte rapide de l'activité antigénique de Gp 84 après iodination ;

2) de la faible affinité des anticorps disponibles contre Gp 84 qui ne permettent pas de dosage plus sensible que l'inhibition de la décompactation.

Toutefois, après marquage au réactif de Bolton-Hunter ( $I^{125}$ ), Gp 84 s'est révélée encore une fois la seule protéine précipitable spécifiquement par les IgG anti-F9.

Enfin, la purification partielle à grande échelle de Gp 84 à partir de tumeurs F9 a été mise au point grâce à un protocole similaire à celui décrit ci-dessus. L'obtention de quantités sensibles de Gp 84 devrait permettre de poursuivre un programme de caractérisation et d'immunisation.

## 2) *Substance favorisant l'agrégation des cellules CE*

Par simple incubation dans du tampon, les cellules CE de la lignée PCC4 Aza libèrent une substance qui provoque l'agrégation de ces mêmes cellules dissociées et maintenues en tampon. Cette substance paraît insensible à la chaleur mais sensible à la trypsine. En filtration sur gel, elle migre en plusieurs pics compris entre des poids moléculaires apparents de 50 000 à 2 000 000. Actuellement, on s'efforce de purifier et d'identifier ce composé en absorbant des extraits marqués à la  $^{35}\text{S}$ -méthionine sur des cellules PCC4 préalablement fixées à la glutaraldéhyde.

Des activités semblables peuvent être obtenues à partir de certaines lignées de cellules différenciées (Pys, cellules de Friend). Le sérum de fœtus de veau semble contenir un inhibiteur de ces substances. Cette molécule peut être purifiée dans les mêmes conditions que la fibronectine, aussi bien par les méthodes de purification classique que sur colonnes de Sépharose-gélatine.

## III. - GROUPE EMBRYOLOGIE (Charles BABINET, Philippe BRULET, Hubert CONDRAMINE, Françoise KELLY).

### A. - *Etude des premiers stades du développement de l'embryon de souris*

Les fragments monovalents anti-F9 (« Fab anti-F9 ») empêchent la transition normale morula → blastocyste du jeune embryon de souris, sans pour autant arrêter la division des blastomères. L'étape dite de « structure compacte » ne se produit pas, non plus que celle qui aboutit à la formation de deux ensembles cellulaires morphologiquement distincts : d'une part la masse cellulaire interne, d'autre part le trophoctoderme. Les études en cours ont pour but d'utiliser cette propriété remarquable des Fab anti-F9 afin d'éprouver l'hypothèse dite « dehors-dedans ». Selon cette hypothèse, ce serait la position des blastomères au sein de la morula qui déterminerait leur devenir, ceux qui se trouvent en position interne devant donner la masse interne, ceux en position externe devant donner le trophoctoderme.

Le schéma expérimental est le suivant : dans un premier temps, on a repéré, par la technique des gels à double dimension, des protéines spécifiques du trophoctoderme d'une part, de l'ICM d'autre part ; dans un deuxième temps, on a recherché l'apparition de ces marqueurs spécifiques en présence de fragment Fab anti-F9.

En présence de ces fragments Fab et dans des conditions où il ne semble y avoir ni « dedans » ni « dehors » pour les cellules, on voit disparaître les marqueurs cellulaires spécifiques du stade 8 cellules, et apparaître les marqueurs de l'ICM et du trophoctoderme. Le développement biochimique n'est donc pas modifié par la présence des fragments Fab anti-F9. Il n'est cependant pas possible de savoir si, en présence de Fab, les marqueurs spécifiques de l'ICM et du trophoctoderme sont formés par une seule ou par deux populations de cellules. Pour aborder cette question, il faut disposer soit d'anticorps, soit de sondes nucléiques spécifiques de chaque marqueur.

Pour préparer des anticorps spécifiques de certains marqueurs en quantités suffisantes, il faut disposer de lignées cellulaires exprimant l'un ou l'autre jeu de marqueurs. On a donc utilisé certaines lignées dérivées de tétatocarcinomes, soit cellules CE, soit trophoblastome, soit certains autres dérivés différenciés. Pour des raisons diverses, on s'est intéressé principalement aux structures appelées « filaments intermédiaires ». Plusieurs types de filaments sont caractérisés biochimiquement : tonofilaments, ionofilaments, etc. Des préparations de filaments intermédiaires ont été obtenues et il a pu être montré que :

- 1) trois des marqueurs spécifiques du trophoctoderme se retrouvent dans les préparations purifiées de filaments intermédiaires. On ne les trouve ni au stade 8 cellules, ni dans la masse interne ;
- 2) ces trois marqueurs se retrouvent dans les préparations obtenues à partir de la lignée de trophoblastomes mais non à partir des cellules CE ;
- 3) les protéines associées aux filaments intermédiaires sont différentes dans différentes lignées cellulaires.

L'ensemble des protéines contenues dans une préparation de filaments intermédiaires (soit une douzaine de protéines majeures) obtenus à partir de la lignée trophoblastome a été utilisé pour préparer des anticorps monoclonaux dirigés contre l'une ou l'autre de ces protéines. Des rats ont été immunisés avec ces préparations et les splénocytes fusionnés avec des cellules de myélome. Plusieurs centaines de clones produisant des anticorps ont été obtenus. Onze ont été choisis pour une étude détaillée. Ces onze hybridomes sont sous-clonés deux fois. L'activité anticorps contenue dans les surnageants des cultures sous-clonées est éprouvée par immunofluorescence sur les cellules de trophoblastome et par fixation de protéines de filaments

intermédiaires marquées par  $^{125}\text{I}$ . Sur les anticorps monoclonaux ainsi obtenus, on recherchera :

- l'activité sur une série de cellules CE ou différenciées ainsi que sur les embryons, 8 cellules, trophoctoderme et masse interne ;
- la protéine cible dans la préparation de filaments intermédiaires obtenus à partir du trophoblastome.

Ce travail est actuellement en cours.

En outre, des populations de RNA messagers ont été isolées tant de différentes lignées cellulaires que d'embryons. Ces populations sont maintenant étudiées dans un système de traduction *in vitro*. C'est ainsi que trois des marqueurs spécifiques du trophoctoderme sont synthétisés *in vitro* à partir des mRNA, isolés du trophoblastome. De même, deux protéines caractérisant la masse interne sont synthétisées par les mRNA de certaines cellules CE.

#### B. - *Sauvetage de mutants létaux du locus T de la souris*

On a recherché s'il était possible de sauver des embryons portant une mutation létale du locus T par agrégation dès les premières étapes du développement embryonnaire, avec un embryon normal. Si c'est le cas, on peut en tirer la conclusion qu'il ne s'agit pas de mutants létaux cellulaires. C'est ce qui a été trouvé pour la mutation dominante T. Une chimère T/T  $\leftrightarrow$  +/+ a été obtenue chez laquelle différents tissus, y compris la lignée germinale, sont constitués en partie de cellules porteuses de la mutation T à l'état homozygote.

#### C. - *Etude des potentialités de différentes lignées de tératocarcinomes par injection dans le blastocyste*

Certaines lignées de cellules CE sont capables de participer au développement normal de l'embryon, d'autres non. Cela a été montré par l'injection de cellules CE dans la cavité d'un blastocyste normal, suivie de la réimplantation de celui-ci dans une femelle pseudo-gestante. L'examen des souris obtenues à partir des blastocystes ainsi opérés permet, grâce à l'utilisation de marqueurs génétiques appropriés, de repérer la participation éventuelle des cellules CE au développement.

On a examiné, *in vitro*, le développement de blastocystes dans lesquels avaient été injectées différentes cellules CE : dans le cas de PCC4 et 1009, qui ne donnent pas de souris mosaïques, les cellules CE poussent à la périphérie du blastocyste étalé. Au contraire, dans le cas de NG2 ou PSA qui donnent des souris mosaïques, on observe une croissance des cellules

CE à partir de la masse interne. Il semble donc qu'un facteur déterminant dans la capacité des cellules CE à « coloniser » l'embryon soit lié à une interaction de celles-ci avec les cellules de la masse interne.

D. - *Interactions de cellules précoces de l'embryon de souris et de virus oncogènes à ADN*

Au cours des années précédentes, on a étudié l'évolution de la susceptibilité à l'infection virale au cours de la différenciation du tératocarcinome. On a montré, en particulier, que les cellules de carcinome embryonnaire sont résistantes à l'infection par le virus du polyome et par SV40 et que cette résistance disparaît au cours de la différenciation. Par contre, un autre virus oncogène à ADN, l'adénovirus humain, infecte avec la même efficacité les cellules CE et les cellules différenciées.

Ces résultats concernant le tératocarcinome étant acquis, on a entrepris l'étude de l'évolution de la sensibilité à l'infection virale au cours des stades précoces du développement de l'embryon de souris. La période qui suit l'implantation paraît particulièrement intéressante : en effet, du 6<sup>e</sup> au 8<sup>e</sup> jour du développement embryonnaire, on peut observer la mise en place des différents feuillettes et l'embryon est encore assez simple pour que l'on puisse espérer étudier l'évolution de la sensibilité au virus sur un petit nombre de types cellulaires définis. De plus, jusqu'au 7<sup>e</sup> jour, l'un des feuillettes, l'ectoderme embryonnaire, est encore multipotentiel.

On a mis au point les techniques de séparation des feuillettes embryonnaires ainsi que les conditions optimales pour le maintien en culture des embryons et de leurs fragments. On a ensuite étudié la susceptibilité des cellules embryonnaires à l'infection par le virus du polyome et par SV40. Les résultats obtenus indiquent qu'au 6<sup>e</sup> et au 7<sup>e</sup> jour du développement embryonnaire, la majorité des cellules est encore résistante à l'infection virale. Puis on observe une augmentation progressive de la fraction de cellules sensibles qui atteint 20 à 30 % pour les cellules d'un embryon de neuf jours. La maturation des cellules embryonnaires s'observe également *in vitro* : des cellules d'embryons de 7 jours deviennent progressivement susceptibles lorsqu'elles sont infectées plusieurs jours après leur mise en culture. Et comme pour les cellules de tératocarcinome au cours de leur différenciation *in vitro*, les différenciations morphologiques précèdent l'apparition de la sensibilité à l'infection virale.

Des expériences d'infection par l'adénovirus sont actuellement en cours.

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

##### A. - Contribution à l'étude génétique du développement et de l'organogenèse de la souris

###### 1) Récupération d'embryons létaux *in utero*

On a montré que des cellules appartenant à des embryons normalement incapables de se développer, pouvaient dans certains cas, participer à la formation d'embryons viables. C'est ainsi qu'on a obtenu plusieurs animaux chimères C57BL/6 ↔ 129 dans lesquels les cellules d'origine C57BL/6 sont porteuses d'une mutation létale qui, normalement, empêche le développement de l'œuf jusqu'à son terme. Cette mutation (Hairy ears : Eh) arrête à l'état homozygote le développement de l'œuf après l'implantation et au moment de la différenciation des feuillettes. Il semble que la partie endodermique de l'embryon soit anormale lorsqu'on considère des coupes histologiques d'embryons précoces.

Ce type de travail définit de manière non ambiguë une classe à part de mutation létale : les *létaux récupérables*. Dans ce type de mutation et, contrairement à ce qui se passe avec  $t^{w18}$ , la létalité ne résulte pas d'un désordre cellulaire mais d'une différenciation anormale d'un type de tissu.

###### 2) 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 dysplasie épidermique typique et sont létaux à la naissance. La mutation Er est donc également une mutation de différenciation intéressant l'épiderme. On a mis en route une nouvelle série d'expériences de transfert d'ébauches tégumentaires pour essayer de déterminer si la maladie est proprement ectodermique ou non.

###### 3) Etude de la stérilité d'hybride

Il existe, dans la nature, plusieurs races de souris qui cohabitent sans jamais s'hybrider spontanément. C'est le cas, en France, avec un certain type de souris définies sous le signe Mus 3 par Louis Thaler et ses collaborateurs à Montpellier (la souris de laboratoire étant Mus 1). Lorsqu'on accouple, au laboratoire des individus Mus 1 avec des Mus 3 (mâle Mus 3), on obtient (moyennant quelques manipulations propres à exacerber l'instinct sexuel) des hybrides viables et normaux mais dont les mâles sont stériles. Ces animaux sont, en quelque sorte, les analogues des mulets dans le genre

Equus, mais ici les femelles F1 sont pleinement fertiles. Le déterminisme génétique de cette stérilité est complexe (au moins 4 gènes), mais il est accessible à l'expérimentation.

En collaboration avec François Bonhomme, on a entrepris la dissection génétique du système où chaque gène (dominant) agit indépendamment et représente autant de mutations modifiant le processus normal de la différenciation cellulaire.

#### B. - 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.

Toutes ces mutations ont été analysées quant à leurs effets embryologiques aux Etats-Unis par L.C. Dunn et son école, et dans notre laboratoire où il a été montré que leur mode d'action devait se situer au niveau de la reconnaissance cellulaire, chaque mutation étant responsable de la synthèse d'un antigène de surface défectif et, par conséquent, inadéquat.

Considérées dans leur ensemble, ces mutations correspondent à 6 groupes de complémentation en ce qui concerne la létalité. Cela 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 démontré qu'il existait plusieurs nouveaux allèles au locus T de la souris qui se caractérisaient par un syndrome léthal jusque-là inconnu. En poursuivant l'analyse des populations sauvages capturées pour la plupart dans le sud de la France métropolitaine et en Corse, nous avons isolé d'autres haplotypes au locus T dont l'un présente une caractéristique extraordinaire et, à l'heure actuelle, complètement inexplicable. Il s'agit d'un haplotype *t* viable (pour lequel la survie de l'homozygote est possible) dont le coefficient de transmission est inférieur à la normale (de l'ordre de

35 %) et qui provoque à l'état homozygote la stérilité des mâles. En ne considérant que ces deux dernières données d'observation, il est impossible de comprendre, du strict point de vue de la génétique des populations, la présence de cet haplotype dans une population sauvage étant donné qu'il aurait dû en être éliminé rapidement.

Contrairement à ce qu'on supposait, il n'a pas été possible de trouver, dans des populations sauvages d'une autre race que *Mus musculus domesticus*, l'équivalent d'un éventuel locus T.

### C. - Découverte de nouvelles mutations chez la souris

Les systèmes d'accouplement utilisés dans l'unité sont, comme on l'a déjà mentionné, favorables à l'observation de nouvelles mutations. On a découvert :

- m<sup>36</sup> : mutation récessive caractérisée par une dystrophie musculaire différente des dystrophies connues chez la souris jusqu'à présent (en cours d'étude, en collaboration avec Robert Whalen).
- m<sup>37</sup> : mutation entraînant l'absence complète de poils après le 14<sup>e</sup> jour de vie extra-utérine (non allélique avec nude).

### PUBLICATIONS

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

F. JACOB. — Mon dissemblable, mon frère. *Mémoires de l'Académie de Chirurgie*, 1979, 105, 105-111.

F. JACOB. — Sexualité et diversité humaine. *Le Monde*, 9 février 1979.

F. JACOB. — The Switch. In « Origins of Molecular Biology ». A tribute to Jacques Monod, A. Lwoff and A. Ullman ed., Academic Press, New York, 1979, p. 95-107.

D. PAULIN, J. PERREAU, H. JAKOB, F. JACOB et M. YANIV. — Tropomyosin synthesis accompanies formation of actin filaments in embryonal carcinoma cells induced to differentiate by hexamethylene bisacetamide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 1891-1895.

M. FELLOUS, J. HORS, J. BOUE, J. DAUSSET et F. JACOB. — Are there human analogs of the mouse T locus in central nervous system malformations? *Birth Defects : Original Articles Series*, 1979, 15, n° 3, 93-104 (The National Foundation ed.).

A. PRUJANSKY-JACOBOWITS, G. GACHELIN, T. MURAMATSU, N. SHARON et F. JACOB. — Surface galactosyl glycopeptides of embryonal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1979, 89, 448-455.

R. KEMLER, D. MORELLO et F. JACOB. — Properties of some monoclonal antibodies raised against mouse embryonal carcinoma cells. In « Cell lineage, stem cells and cell determination ». I.N.S.E.R.M. symp. n° 10, N. Le Douarin éd., 1979. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 101-113.

T. MURAMATSU, G. GACHELIN et F. JACOB. — Characterization of glycopeptides isolated from membranes of F9 embryonal carcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 587, 392-406.

I. DUNIA, J.F. NICOLAS, H. JAKOB, E.L. BENEDETTI et F. JACOB. — Junctional modulation in mouse embryonal carcinoma cells by Fab fragments of rabbit anti-embryonal carcinoma cell serum. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 3387-3391.

T. MURAMATSU, G. GACHELIN, M. DAMONNEVILLE, C. DELARBRE et F. JACOB. — Cell surface carbohydrates of embryonal carcinoma cells : polysaccharidic side chains of F9 antigens and of receptors to two lectins, FBP and PNA. *Cell*, 1979, 18, 183-191.

F. JACOB. — Cell surface and early stages of mouse embryogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, Academic Press, New York, 1979, 13, 117-137.

D. MORELLO. — Etude de la relation entre l'antigène embryonnaire F9 et les antigènes adultes H-2 à l'aide d'un sérum de lapin anti-H-2. Thèse de 3° cycle, Paris, 10 mars 1978.

G.R. BORDENAVE et C. BABINET. — Immunoglobulin allotypy of allophenic rabbits. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 1979, 130 C, 181-197.

F. KELLY, J.L. GUENET et H. CONDAMINE. — Karyologically identified homozygous  $t^{w18}$  embryos : extrauterine growth properties and transformation by SV40. *Cell*, 1979, 16, 919-927.

J.L. GUENET, G. MARCHAL, G. MILON, P. TAMBOURIN et F. WENDLING. — Fertile dominant spotting ( $W^f$ ) ; a new allele at the W locus. *J. Heredity*, 1979, 70, 9-12.

J.L. GUENET, B. SALZGEBER et M.T. TASSIN. — Repeated epilation : a genetic epidermal syndrome in mice. *J. Heredity*, 1979, 70, 90-94.

J.F. NICOLAS. — Cellular interactions between embryonal carcinoma cells. In « Cell lineage, stem cells and cell determination ». N. Le Douarin éd., North Holland, Amsterdam, 1979, 31-139.

J.F. NICOLAS. — Tératocarcinome de la souris : mise au point d'un système modèle d'étude de la différenciation des cellules multipotentielles en culture. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, 1979.

F. HYAFIL et J. STROMINGER. — Dissociation and exchange of the  $\beta_2$ -microglobulin subunit of HLA-A and HLA-B antigens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 5834-5838.

J.L. GUENET. — Des souris mongoliennes. *La Recherche*, 1979, 10, n° 98, 288-290.

J.L. GUENET. — A sex-linked coat-colour mutation in the mouse non transmissible through the female. *Genet. Res.*, 1979, 13, 163-167.

J.P. ROUSSET, P. DUBOIS, C. LASSERRE, D. AVILES, M. FELLOUS et J. JAMI. — Phenotype and surface antigens of mouse teratocarcinoma x fibroblast cell hybrids. *Somat. Cell. Genet.*, 1979, 5, vol. 6.

J.D. FABRICANT, M. HOFNUNG et F. KELLY. — Sister chromatid exchange induction by mitomycin C is deficient in embryonal carcinoma cells. *Mutation research*, 1979, 63, 215-219.

R. KEMLER. — Cell surface antigen during early embryonic development. *Hereditas*, 1979, 89, 142.

P. DUBOIS. — Antigènes de surface du tératocarcinome de la souris *in vitro*. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, déc. 1979.

D. MORELLO. — Des anticorps à la carte. *La Recherche*, 1979, 10, n° 98, 287-288.

F. KEPPEL, B. ALLET et H. EISEN. — Biochemical properties and localization of the chromosomal protein IP25. *Eur. J. Biochem.*, 1979, 96, 477-482.