

### Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Cette année, le cours n'a pas eu lieu. Le séminaire a porté sur des recherches consacrées à des problèmes de différenciation cellulaire et de morphogenèse chez la *Drosophile*.

M<sup>me</sup> Nicole PRUD'HOMME, professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, a décrit la régulation des gènes ribosomiaux chez la *Drosophile*.

M. Antonio GARCIA-BELLIDO, professeur à l'Université de Madrid, dans une conférence intitulée « Cell differentiation : from the gene to the pattern » a proposé un mécanisme de régulation génétique dans l'établissement de patrons morphogénétiques.

M<sup>me</sup> Patricia SIMPSON, chargée de recherches au C.N.R.S., a exposé ses recherches sur la croissance et sa régulation dans les compartiments des disques imaginaux de la *Drosophile*.

M. Jean-Antoine LEPESANT, chargé de recherches au C.N.R.S., a fait le point des recherches actuelles sur la régulation de l'expression génétique et du développement par l'ecdysone chez *Drosophila melanogaster*.

M. Bruno JARRY, chargé de recherches au C.N.R.S., a rassemblé les données qu'il a obtenues sur le rôle morphogénétique des pyrimidines chez la *Drosophile*.

M. Marko ZALOKAR, directeur de recherches au C.N.R.S., a fait un exposé sur le déterminisme précoce dans le développement embryonnaire.

M. Walter J. GEHRING, professeur à l'Université de Bâle, a donné une conférence intitulée « Determination of germ cells » sur l'établissement de la lignée germinale chez la *Drosophile*.

M. Philippe L'HERITIER, professeur à l'Université de Clermont-Ferrand, a décrit un phénomène de dysgénésie hybride chez *Drosophila melanogaster* et l'interaction inducteur-réacteur.

M<sup>me</sup> Christiane NÜSSLEIN-VOLHARD, chef de laboratoire au laboratoire européen de Biologie Moléculaire à Heidelberg, a présenté une analyse génétique de la segmentation chez la *Drosophila*.

M. Pedro SANTAMARIA, chargé de recherches au C.N.R.S., a traité de la morphologie de la mouche haploïde.

#### ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Au cours de l'année écoulée, l'étude de la différenciation cellulaire s'est poursuivie dans le laboratoire situé à l'Institut Pasteur. Ainsi qu'il a été précisé dans les précédents rapports, cette étude met en jeu deux matériels : le tératocarcinome de la souris et les embryons de souris aux stades précoces de leur développement. C'est en comparant sans cesse ces deux matériels qu'on espère pouvoir analyser les premiers stades du développement embryonnaire chez la souris. Pour la commodité de l'exposé, les résultats obtenus seront décrits sous quatre rubriques correspondant aux différents groupes composant l'unité. 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, Jiri FOREJT, François JACOB, Hedwig JAKOB, Françoise KELLY, Jean-François NICOLAS, Marcello SINISCALCO, Anna STARZINSKI-POWITZ).

##### A. - *Recherches de mutants de cellules de carcinome embryonnaire*

On ignore encore si les plages de cellules différenciées — nerf, muscle, cartilage, etc. — formées dans les cultures de cellules de carcinome embryonnaire (CE) sont ou non d'origine clonale. L'utilisation de mutants cellulaires, déficients en hypoxanthine phosphoribosyl-transférase (HPRT) ou résistants à la ouabaïne n'a pas permis de répondre à cette question, les phénomènes de coopération métabolique entre cellules voisines brouillant totalement les cartes.

En revanche, certains mutants cellulaires thermosensibles devraient se prêter à une telle étude. Deux mutants ont ainsi été obtenus après mutagenèse de cellules CE PCC3. Ces mutants conservent leur caractéristique de différenciations multipotentielle *in vivo*. *In vitro*, par contre, leur capacité de différenciation est un peu modifiée par rapport à la souche d'origine ; elles

produisent, notamment, beaucoup plus de cellules musculaires que ces dernières. Les propriétés de ces mutants sont maintenant à l'étude.

Plusieurs mutants résistant au bromodeoxyuridine Bu<sup>R</sup> et déficients en thymidine-kinase (TK<sup>-</sup>) ont été obtenus à partir des lignées CE PCC4 et F9. Toutefois, tous ces mutants réversent facilement et produisent un grand nombre de colonies sur milieu sélectif HAT. En outre, plusieurs d'entre eux sont assez différents de la souche d'origine et ne présentent plus les mêmes propriétés de différenciation.

#### B. - *Différenciation de cellules CE induites par certains composés*

L'étude de la différenciation induite par l'hexaméthylène bisacétamide (HMBA), l'acide rétinoïque et le dibutyryl-cAMP a été poursuivie. Plusieurs lignées de cellules CE ont ainsi été étudiées. Les résultats obtenus avec chacun des composés mentionnés varient suivant la souche, une fraction plus ou moins importante des populations cellulaires se différenciant. Par exemple, les deux souches, dites « nullipotentes », LT<sub>1</sub> et F9 se comportent de manière différente sous l'effet de l'acide rétinoïque.

Les changements dans les éléments du cytosquelette ont été analysés à l'aide d'antisérums spécifiques contre la vimentine, la desmine ou certaines prékeratines. De même les types de collagène produits ont été précisés à l'aide d'antisérums. Il semble bien que le type de cellules différenciées obtenu en majorité diffère selon la souche (par exemple PCC3 et F9) et selon l'inducteur (HMBA et acide rétinoïque). On a commencé à étudier l'effet des mêmes inducteurs sur des hybrides tétraploïdes de type (PCC4 × F9) et (PCC4 × LT<sub>1</sub>).

Après traitement de cellules F9 par l'acide rétinoïque, des lignées à caractère d'endoderme ont été isolées par Solter aux Etats-Unis. De telles lignées n'ont pu être obtenues dans nos expériences car les cellules différenciées ne se divisent que pendant quelques générations après traitement par acide rétinoïque.

#### C. - *Etude d'hybrides tétraploïdes obtenus par fusion de cellules CE présentant des propriétés différentes*

Pendant longtemps, il a été difficile d'obtenir des hybrides tétraploïdes stables après fusion de deux types de cellules CE : les hybrides formés revenaient rapidement à un caryotype voisin du caryotype diploïde normal.

En utilisant une nouvelle lignée (PCC4 Aza<sup>R</sup> Cap<sup>R</sup>, lignée PCC4 résistantes à l'azaguanine et au chloramphenicol), il a été possible d'obtenir des tétraploïdes stables de type (PCC4 × PCC3), (PCC4 × F9) et (PCC4 × LT<sub>1</sub>). On a alors étudié les produits de ces hybrides et notamment :

- la tumorigénicité ainsi que les capacités de différenciation tant *in vivo* qu'*in vitro*. Les résultats diffèrent selon les hybrides, le caractère multipotentiel du parent PCC4 étant ou non conservé selon les cas ;

- le comportement après infection par des virus mutants obtenus à Villejuif par Marc Vasseur. La plupart des hybrides se comportent comme PCC4 et non comme F9.

On ignore encore pourquoi le variant PCC4 Aza<sup>R</sup> Cap<sup>R</sup> permet d'obtenir des tétraploïdes stables et, en particulier, si la résistance au chloramphenicol, qui est un caractère mitochondrial, joue un rôle en cette affaire.

#### D. - Essai de transformation de cellules CE par de l'ADN

En collaboration avec Moshe Yaniv, on a essayé de transformer les cellules CE avec l'ADN de deux plasmides PBR 322 modifiés par Paul Berg. L'un contient une insertion portant un gène GPRT d'origine bactérienne et un fragment de virus polyome. L'autre contient un fragment du virus de l'herpès portant le gène TK<sup>+</sup>. Le premier permet de sélectionner des cellules HGPRT<sup>-</sup> transformées, le second des cellules TK<sup>-</sup> transformées. Plusieurs expériences ont été réalisées sans résultats significatifs. Dans un cas où le gène TK du virus herpès était ajouté à des cellules PCCA Bu<sup>R</sup> (TK<sup>-</sup>), des colonies TK<sup>+</sup> ont été obtenues en nombre environ 10 fois supérieur à celui du témoin, où l'on observe des réversions des cellules TK<sup>-</sup>. Les colonies obtenues contiennent de l'activité TK mais la nature de la thymidine-kinase en cause n'a pas encore été précisée. De toute façon, la fréquence de transformation, s'il s'agit bien de cellules transformées, serait très faible, très inférieure à ce qu'on observe, dans les mêmes conditions, avec des fibroblastes.

#### E. - Cellules de Friend et protéine IP25

1) *Chimie*. La protéine IP25 a été purifiée à l'homogénéité. La protéine semble être formée de deux sous-unités dont la composition en acides aminés, les empreintes peptidiques après traitement par le bromure de cyanogène, la trypsine et la protéase V8 de staphylocoque sont identiques. Les sous-unités diffèrent légèrement par leurs charges et peuvent être séparées sur gel ou sur colonne. Chaque sous-unité est capable de se fixer à l'ADN et, ajoutées ensemble, elles condensent et précipitent l'ADN. L'IP25 pourrait donc jouer un rôle dans la « compaction » de la chromatine.

On a aussi montré que, dans l'IP25, la majeure partie des lysines sont localisées dans la moitié C-terminale de la molécule alors que la moitié N-terminale possède la quasi-totalité des résidus acides. Ces propriétés sont semblables à celles observées chez les répresseurs dans les microorganismes.

2) *Distribution*. Les études sur la distribution de l'IP25 *in vivo* ont été poursuivies pendant le développement de l'embryon de souris et de rat ainsi que chez l'adulte. En général, dans les tissus solides, la protéine est présente uniquement dans les cellules terminales et fonctionnelles. Dans le cas des glandes dont l'activité dépend de certaines hormones, la protéine IP25 n'est trouvée qu'en présence de l'hormone de maintien. Chez les animaux où l'hormone de maintien a été supprimée par ablation de la glande productrice, l'injection de l'hormone de maintien provoque la réapparition de l'IP25 dans les cellules cibles.

Dans le foie de rat en régénération, l'IP25 disparaît sans changement des histones H1. La disparition de l'IP25 commence après le début de la synthèse de l'ADN. Il semble y avoir une corrélation entre son apparition et la dérégulation d'activités fœtales, telles que l' $\alpha$ -fœtoprotéine et la pyruvate-kinase du type III. L'IP25 retourne à son niveau normal après 5-6 jours, quand s'arrête la synthèse des fonctions fœtales et réapparaissent les fonctions adultes comme l'albumine. On a aussi examiné la synthèse de l' $\alpha$ -fœtoprotéine et de l'albumine en fonction de la présence de l'IP25 dans les hépatomes *in vitro*. Dans ce cas, il y a une corrélation entre l'induction de l'IP25, l'arrêt de la synthèse de l' $\alpha$ -fœtoprotéine et la stimulation de la production d'albumine.

L'IP25 peut être induite dans les cellules en culture par plusieurs agents chimiques. Parmi ces agents, l'acide butyrique semble être le plus efficace car il agit sur tous les types cellulaires étudiés. Le DMSO et l'HMBA induisent certains types cellulaires mais pas tous. Dans certaines cellules, il y a une corrélation entre l'apparition de l'IP25 et une différenciation morphologique. Néanmoins, dans tous les types cellulaires, l'induction d'IP25 entraîne l'arrêt de la synthèse de plusieurs protéines majeures.

On peut donc envisager deux rôles possibles pour l'IP25 *in vivo*. Tout d'abord, étant donné la corrélation inverse observée entre la présence de l'IP25 et l'expression de certains gènes fœtaux, elle pourrait agir comme répresseur de ces gènes dans les cellules terminales et fonctionnelles. Ainsi s'expliquerait l'absence d'IP25 dans les tissus embryonnaires ou en régénération.

L'autre rôle possible pour l'IP25 serait celui d'inducteur de certaines fonctions des cellules hautement différenciées. Cette hypothèse est en accord avec les observations sur la disparition de la protéine dans les glandes privées de leurs hormones de maintien. Dans cette hypothèse l'IP25 pourrait changer la structure de la chromatine de façon telle que les gènes cibles deviendraient accessibles à l'appareil de transcription.

II. - GROUPE IMMUNOLOGIE (Marie-Hélène BUC, Marc FELLOUS, Gabriel GACHELIN, François HYAFIL, Rolf KEMLER).

A. - Etude des antigènes F9

1) *Sérologie*. La description des différents motifs antigéniques reconnus par le sérum syngénique 129/Sv anti-F9 a été poursuivie. Les différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines responsables de l'activité anti-F9 ont été purifiées. Leur activité sur un ensemble de cellules-types a été déterminée par immunofluorescence directe.

Les IgM anti-F9, qui sont responsables de toute l'activité cytotoxique du sérum total, reconnaissent des sites antigéniques présents à la surface des cellules CE. Ces IgM représentent la seule fraction de sérum correspondant à la définition initiale du sérum : reconnaissance d'un antigène de surface exprimé sur les cellules CE et non sur les cellules différenciées. Des récepteurs aux IgM sont exprimés à la surface de l'embryon au cours des premières étapes de son développement.

Les IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>2a</sub> anti-F9 reconnaissent aussi bien certaines lignées CE (non pas toutes) et certaines lignées différenciées. Seuls les récepteurs aux IgG<sub>2a</sub> sont exprimés, de façon très transitoire, à la surface des morulas. Quelques résultats préliminaires sur le déterminisme génétique de l'expression de ces antigènes sur l'œuf ont été obtenus.

2) *Etudes sur la nature biochimique des antigènes F9*. Les substances portant les différents motifs antigéniques reconnus par les IgM, IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>2a</sub> anti-F9 ont été isolées par immunoprécipitation à partir de cellules F9 radiomarquées. Les anticorps, et en particulier les IgM, reconnaissent plusieurs types de composés :

a) des glycopeptides, et en particulier du paragloboside et des glycolipides de la série H (H<sub>3</sub> ou H<sub>4</sub>) ;

b) des glycoprotéines, de poids moléculaire 46 000 et 30 000 respectivement.

Ces glycoprotéines libèrent des glycopeptides de haut poids moléculaire, totalement hydrolysables par l'endoglycosydase H de Fukuda et sans doute apparentés aux substances H des groupes sanguins.

Les récepteurs aux IgG<sub>1</sub> et aux IgG<sub>2a</sub> appartiennent aux mêmes catégories de molécules, mais sont en quantités plus faibles et sont sérologiquement distincts les uns des autres.

3) *Etude sur les glycopeptides de haut poids moléculaire caractéristique des cellules embryonnaires précoces*. Cette étude, menée en collaboration

avec T. Muramatsu de l'Université de Kagashima (Japon), est poursuivie. La détermination de la structure de ces glycopeptides est en cours : la structure de base est une unité Gal $\beta$ (1  $\rightarrow$  3)GlucNac répétée et fortement branchée ; l'analyse des dérivés perméthylés a débuté en septembre 1980 et devrait permettre de connaître les branchements au début de l'année.

B. - *Structures d'agrégation des stades précoces du développement : fragment de protéine gp84*

L'agrégation des cellules CE et celle des cellules de morula est inhibée par des fragments monovalents Fab d'IgG provenant de lapins immunisés contre des cellules CE F9. Au cours de l'année précédente, on a purifié à partir de membranes de cellules CE un fragment de glycoprotéine capable d'absorber l'activité inhibitrice des fragments anti-F9. Ce fragment a un PM apparent de 84 000 et est désigné sous le nom de gp84. Ce fragment purifié inhibe la « décompaction » ou l'absence de « compaction » des stades morulas de l'embryon par les anticorps anti-F9 de lapin.

1) *Purification de gp84, fragment tryptique de la cible des Fab.* Il y a maintenant de bonnes raisons de penser que gp84 est bien une forme soluble de la cible des Fab anti-F9 : en effet gp84 et l'activité inhibitrice des Fab co-migrent sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. La purification à grande échelle (à partir de 50 à 200 g de tumeurs F9) a d'autre part été poursuivie et permet d'obtenir une préparation de pureté supérieure à 50 %. Les rendements sont presque quantitatifs et permettent l'obtention d'environ 1  $\mu$ g de gp84 par gramme de tumeur solide. Ce taux de purification et la découverte des conditions de stabilisation de gp84 (voir ci-dessous) ont permis la mise au point d'un dosage radioimmunologique qui est maintenant utilisé en routine pour les purifications et pour les tentatives, jusqu'à présent infructueuses, d'obtenir des anticorps monoclonaux contre gp84.

2) *La fixation de Ca<sup>2+</sup> sur gp84 induit un changement de conformation qui peut être impliqué dans l'activité biologique de la molécule.* Au cours des expériences de purification, il est apparu que le fragment gp84 peut être obtenu par traitement trypsique de membranes de cellules CE si l'extraction est faite dans du milieu de culture mais non dans un tampon simple (PBS par exemple). On a alors identifié le Ca<sup>2+</sup> comme étant l'agent qui protège gp84 contre la dégradation trypsique et montré que gp84 existe sous deux formes : une forme ayant fixé un (ou plusieurs) Ca<sup>2+</sup>, résistante à toute concentration de trypsine et une forme sans Ca<sup>2+</sup>, sensible. Le K<sub>o</sub> du Ca<sup>2+</sup> a été mesuré : il est d'environ 2  $\mu$ M. Le fait que gp84 est une protéine sur laquelle le calcium se fixe et induit un changement de conformation peut être rapproché de l'effet biologique du Ca<sup>2+</sup> ; il a en effet été montré par Ducibella que le Ca<sup>2+</sup> est nécessaire à la « compaction » des embryons. On a essayé de démontrer que ces deux effets étaient liés en étudiant d'autres

ions métalliques. On a ainsi pu montrer que le  $Mn^{2+}$  et le  $Sr^{2+}$  protégeaient gp84 contre la digestion trypsique et empêchaient la décompaction de cellules CE dans du milieu sans  $Ca^{2+}$ . D'autres métaux tels que  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , etc., n'ont aucun effet dans l'un et l'autre tests. Ces résultats suggèrent donc fortement que le changement de conformation induit par le  $Ca^{2+}$  est nécessaire à l'activité biologique de gp84 au cours de la compaction.

3) *Le sucre de gp84.* On a étudié un résidu glycosylé de poids moléculaire environ 3 500. Ce sucre est responsable de la fixation sur ConA ; il apparaît comme « N-lié » (sa synthèse est inhibée par la tunicamycine) et est probablement de type « complexe ». Ce sucre n'est pas impliqué dans la fixation du  $Ca^{2+}$  ou dans la résistance à la trypsine. On cherche maintenant si ce sucre est unique.

4) *Répartition de gp84 sur différents types de cellules.* gp84 a pu être décelé (par purification) dans un grand nombre de cellules CE, sur PYS et très faiblement sur une lignée trophoblastique. gp84 a pu aussi être décelé sur des cellules testiculaires de différentes lignées de souris. Enfin on a trouvé des molécules semblables sur des cellules testiculaires de rat et sur un tératome humain.

### C. - Recherche de marqueurs pour la différenciation du blastocyste

La première différenciation visible chez un embryon de mammifère survient au cours de la transformation morula-blastocyste. Une morula est constituée de 20 à 50 cellules en apparence toutes identiques. Un blastocyste est constitué de deux types cellulaires : un feuillet externe ou trophoctoderme qui enveloppe une petite masse de cellules internes (MCI). Le feuillet externe donnera la partie embryonnaire du placenta. La MCI produira l'embryon proprement dit et les annexes. On a recherché des marqueurs de différenciation que l'on puisse utiliser au niveau moléculaire lors de la formation du blastocyste de la souris.

#### 1) *Caractérisation d'anticorps monoclonaux (mAb) contre les protéines des filaments intermédiaires du trophoblastome*

a) *Caractérisation biochimique.* Ces structures filamenteuses étant insolubles, sauf dans des conditions dénaturantes très fortes, une nouvelle méthode d'analyse a été mise au point. Après fractionnement par électrophorèse sur gel à deux dimensions, le mélange antigénique est transféré sur du papier DBM, puis traité successivement avec un mAb, puis avec un anti-mAb marqué à l'iode. Les antigènes sont alors révélés par fluorographie. Cette méthode a été utilisée pour plusieurs mAbs. L'un de ceux-ci reconnaît les protéines spécifiques du trophoctoderme. b) *Caractérisation des antigènes au cours du développement et réaction sur des systèmes cellulaires de différenciation*

*in vitro*. Cette étude a été faite en utilisant des techniques d'immunofluorescence sur couche mince.

2) *Protéines spécifiques de la masse cellulaire interne*. Dans un premier temps, les histones ont été analysés sur des cellules en culture, par gel à deux dimensions Triton/acide/urée, puis SDS. Pour l'instant on n'a pas trouvé de différence majeure entre trophoblaste et MCI. Une protéine très abondante dans la MCI — et qui n'est pas décelable en gel à deux dimensions dans les cellules différenciées — a été purifiée pratiquement à homogénéité. Cette protéine est nucléaire et s'élué de la chromatine avec 0,35 M de sel. On a préparé un antiserum par injection de cette protéine purifiée dans les lapins. Ce sérum est actif au 1/500 par immunofluorescence. Au cours de cette purification, une autre protéine de la chromatine (vraisemblablement HMG 1) a été purifiée aussi.

3) *Clonage de gènes codant pour les protéines marqueurs de la différenciation lors de la formation du blastocyste*. Dans un premier temps, on a mis au point un test sur les ARN messagers. Les mARN de différentes cellules sont traduits *in vitro* dans un système de réticulocytes de lapin. Ce mélange de protéines est incubé sur du plastique sur lequel ont été attachés des anticorps préparés contre l'ensemble des protéines des filaments intermédiaires du trophoblaste et purifiés sur des colonnes d'affinité. L'anticorps monoclonal est ajouté et son accrochage spécifique est décelé par l'activité de la phosphatase alcaline couplée à un anti-mAb, le substrat pour la phosphatase étant radioactif. Ce test s'est révélé être très sensible et hautement spécifique.

Une banque de cDNA du trophoblaste a été préparée dans *E. coli*. Cette banque a été analysée avec des sondes de <sup>32</sup>P-cDNA préparés à partir du trophoblaste, de cellules CE F9, ainsi que de cellules 1144 (un fibroblaste embryonnaire). Une quarantaine de clones spécifiques du trophoblaste ont ainsi été isolés. Un travail semblable à partir d'une banque de cDNA de cellules CE PCC3 est maintenant effectué en vue d'isoler des clones caractérisant les cellules CE totipotentes. Pour obtenir des sondes plus spécifiques, on a réalisé des fractionnements du mRNA sur gel d'agarose contenant du CH<sub>3</sub>HgOH.

#### D. - *Utilisation des mAb contre les protéines du trophoblaste dans différents systèmes de différenciation*

1) *Au cours du développement de l'embryon*. Des coupes minces d'embryons de souris sont préparées à des temps variables du développement. La présence des antigènes reconnus par trois différents mAbs, préparés contre les filaments intermédiaires du trophoblaste, a alors été analysée par immunofluorescence indirecte. Jusqu'au 12<sup>e</sup> jour de la vie embryonnaire les cellules épithéliales des trois couches germinales sont marquées par les trois

mAbs. Plus tard et dans les tissus adultes, seules les cellules épithéliales d'origine mésodermique et endodermique sont marquées. Fait intéressant, à partir du 12<sup>e</sup> jour, les cellules épithéliales de la peau deviennent négatives. Des différences fines dans l'expression des antigènes reconnus par les trois mAbs ont été notées. Tout particulièrement l'un de ceux-ci semble ne pas marquer les cellules endodermiques. L'emploi de ces trois mAbs devrait donc permettre de distinguer les cellules trophodermiques des cellules endodermiques.

2) *Sur des systèmes cellulaires de différenciation in vitro.* Un premier système étudié consiste à former des boules de cellules totipotentes de CE NG2 en les empêchant de s'attacher à un substrat. Ces boules mises en culture s'entourent d'une couche différenciée d'endoderme. Des coupes de ces boules cellulaires ont été traitées par les trois mAbs et analysées par immunofluorescence indirecte. Avec deux des trois mAbs, la masse interne totipotente reste complètement négative alors que la couche externe d'endoderme forme un anneau positif très brillant. Le troisième mAb semble ne pas reconnaître la couche externe.

3) *Sur des systèmes cellulaires induits.* Comme on l'a vu précédemment, on peut induire la différenciation de cellules CE en les traitant par certains composés comme HMBA ou l'acide rétinoïque. On étudie maintenant l'apparition des marqueurs repérés par les trois mAbs chez les cellules CE ainsi induites. Après traitement de cellules CE PCC3 avec HMBA pendant 5 jours, la grande majorité des cellules réagit avec deux mAbs, mais non avec la troisième.

### III. - GROUPE EMBRYONS DE SOURIS (Charles BABINET, Philippe BRÛLET, Hubert CONDAMINE, Françoise KELLY, Yi-Sheng XU).

#### A. - Sauvetage de mutants létaux récessifs

Les souris dites allophènes ou tétraparentales sont formées par la fusion de deux morulas de génotypes différents suivie de réimplantation dans une mère nourricière. De telles souris possèdent des cellules de l'un et de l'autre génotype dans divers tissus. On peut se demander si la fusion d'une morula de génotype normal avec une morula homozygote pour une mutation récessive létale permet de « sauver » les cellules de ce dernier génotype. On a étudié notamment par cette méthode des souris homozygotes pour un haplotype *t* de la souris, soit *T*, soit *t<sup>w18</sup>*. On a pu ainsi obtenir des souris allophènes de type  $T/T \leftrightarrow +/+$  mais non pas des souris de type  $t^{w18}/t^{w18} \leftrightarrow +/+$ .

B. - *Etude des potentialités de différentes lignées de tératocarcinome par injection dans le blastocyste*

Parmi les lignées de cellules CE, certaines sont capables de coloniser l'embryon, d'autres non. On a comparé ces deux types de lignées par injection d'un petit nombre de cellules CE dans la cavité d'un blastocyste que l'on met ensuite en culture. Dans le cas des lignées PCC4 et 1009 qui ne donnent pas de souris chimères, les cellules poussent à la périphérie du blastocyste étalé. Au contraire, dans le cas des lignées NG2 ou PSA qui donnent des souris chimères, on observe une croissance des cellules CE à partir de la masse cellulaire interne. Il semble donc qu'un facteur déterminant dans la capacité des cellules à coloniser l'embryon soit lié à une interaction de celles-ci avec les cellules de l'ICM.

C. - *Infection d'embryons par le virus SV 40*

1) *Essai d'intégration de SV 40 dans le génome cellulaire chez la souris.* Les expériences réalisées par R. Jaenisch en 1976 ont permis d'obtenir, après infection par MuLV de morulas qui sont ensuite réimplantées dans des mères adoptives, des animaux qui présentent un génome viral intégré dans le génome cellulaire et le transmettent de façon verticale à leur descendance. Une première tentative infructueuse avait été réalisée avec SV 40. On a repris ces expériences en collaboration avec Keith Willison (Cold Spring Harbor). Dans une première expérience, une dizaine d'animaux ont été obtenus à partir d'embryons infectés par SV 40 au stade morula (environ  $10^4$  PFU/embryon). On a recherché par la technique de Southern la présence de séquences virales dans l'ADN extrait de plusieurs organes de ces animaux. Un des animaux présentait une séquence virale de plus haut poids moléculaire que l'ADN viral, donc vraisemblablement intégré et identique dans les divers organes examinés. L'intégration semblait donc s'être produite tôt dans le développement de l'animal. Cependant, dans une deuxième expérience réalisée sur l'ADN d'embryons de 12 jours faite pour préciser la fréquence du phénomène d'intégration, on n'a trouvé que des séquences virales libres et ceci dans environ 10 embryons sur 30. Ces résultats indiquent que l'intégration, si elle se produit effectivement, reste un événement rare qui limite l'utilisation de SV 40 comme vecteur pour l'introduction de gènes étrangers dans l'animal.

2) *Expression de SV 40 dans les embryons précoces de souris.* On a montré précédemment que les cellules de l'ectoderme embryonnaire, aux 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jours du développement, sont résistantes à l'infection par le SV 40 et par le virus du polyome ; l'apparition de la sensibilité à l'infection virale suit de peu celle des différenciations morphologiques. On a continué cette étude sur les embryons avant l'implantation. On a observé que les morulas

sont également résistantes à l'infection par SV 40, même pour des multiplicités d'infection élevées (de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$  PFU par embryon). Cependant, dans ce cas, lorsqu'on laisse les embryons se développer et s'attacher sur boîte de culture de tissu, on observe l'expression de l'antigène T au niveau des noyaux des cellules trophoblastiques. Ces résultats indiquent là encore que le virus peut persister dans les cellules et s'exprimer lorsqu'un état de différenciation adéquat apparaît.

#### D. - Culture de cellules multipotentielles

Les cellules d'ectoderme embryonnaire d'embryons de 6 à 7 jours ont, en culture, une morphologie très proche de celle des cellules de tératocarcinome. En faisant varier les conditions de culture et en utilisant divers mutagènes ou irradiation gamma, on a tenté de favoriser leur prolifération, mais sans succès jusqu'à présent. On a également réalisé des cultures de crêtes génitales d'embryons de 12 jours dans lesquelles on peut aisément reconnaître les cellules germinales par leur morphologie et par le fait qu'elles renferment de la phosphatase alcaline. On peut observer les cellules pendant plusieurs jours, mais les cultures sont ensuite envahies de cellules fibroblastiques.

#### E. - Transformation de cellules de tératocarcinomes porteurs d'haplotypes *t*

Afin de préciser le rôle des antigènes viraux dans l'obtention de lignées homozygotes après transformation par SV 40, on a infecté des cellules de tératomes homozygotes  $t^{w18}/t^{w18}$ , avec un double mutant de la région précoce de SV 40, qui porte d'une part une mutation thermosensible, tsA 58, dans le gène de la protéine T et d'autre part une délétion dans le gène de la protéine *t*. A partir de 6 embryons jour 7, résultant d'un croisement entre hétérozygotes  $+/t^{w18}$  et réimplantés sous la capsule testiculaire, on a obtenu 5 tératomes dont 3 hétérozygotes et 2 homozygotes  $t^{w18}$  (identifiés d'après leur caryotype). Contrairement aux observations antérieures, on n'a pas observé de prolifération active à partir des cultures homozygotes. Après plusieurs semaines, on observe une prolifération de cellules fibroblastiques hétérozygotes provenant de cellules testiculaires contaminantes. Ces résultats conduisent à penser que la correction de l'effet de la mutation  $t^{w18}$  sur la croissance cellulaire par la transformation virale pourrait être liée à la présence de l'antigène *t*.

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

#### A. - Etude de l'haplotype $t^{w18}$

Une expérience a été tentée pour localiser le facteur létal lié à l'haplotype  $t^{w18}$ , haplotype qui n'est pas considéré comme réduisant drastiquement la

fréquence de recombinaison entre les locus T et H2 sur le chromosome 17. Un mâle  $T\ tf/t^{w18}+$  (où  $tf$  est un marqueur récessif du pelage situé à environ 8 unités de recombinaison de T) était croisé avec des femelles homozygotes  $+tf/+tf$ . La descendance comporte deux classes : souris à queue courte et souris à queue longue. Les recombinants sont repérés comme souris à queue courte chez lesquelles le marqueur  $tf$  n'est pas exprimé (génotype  $T+ / +tf$ ), ou comme souris à queue longue homozygote pour  $tf$  (génotype  $t\ tf / +tf$ ). Pour déterminer si le chromosome recombinant possède ou non le facteur létal de l'haplotype  $t^{w18}$ , les recombinants du premier type sont recroisés avec un animal de type parental  $T+ / t^{w18}+$ . La présence de souris sans queue dans la descendance (qui ne peuvent avoir que le génotype  $T+ / t^{w18}+$ ) signifie que le chromosome recombinant  $T+$  ne porte pas le facteur létal. Un test de même type, bien que nécessitant un croisement supplémentaire, est appliqué à l'étude des recombinants du 2° type.

Au total 13 recombinants ont été obtenus, avec une fréquence d'environ 3 %. Cela indique que même dans le cas de  $t^{w18}$ , la fréquence de recombinaison entre T et  $tf$  est diminuée, moins toutefois que chez les autres haplotypes létaux. 3 recombinants étaient du 1<sup>er</sup> type ( $T+ / +tf$ ) et dans chaque cas on a pu montrer que le facteur létal n'était pas porté par le chromosome  $T+$ . En revanche, l'étude des recombinants du 2° type s'est révélée très difficile en raison de phénomènes de stérilité imprévus. Toutefois, dans 2 cas, la présence du facteur létal sur le chromosome recombinant du type  $t\ tf$  a pu être à peu près démontrée. Ces faits, encore fragmentaires, appellent une double conclusion. D'une part, le facteur létal de l'haplotype  $t^{w18}$  est beaucoup moins lié au locus  $tf$  que les autres facteurs létaux  $t$  étudiés jusqu'à présent. Par ailleurs, on pourrait rendre compte de la diminution de fréquence de recombinaison entre T et  $tf$  en admettant que le chromosome  $t^{w18}$  possède dans cette région un segment de chromatine  $t$  le long duquel la recombinaison est totalement inhibée, et un segment de chromatine « normale » où la recombinaison a lieu librement. La chromatine  $t$  serait du côté T et porterait le facteur létal ; son extrémité côté  $tf$ , serait à environ 3 unités de recombinaison de ce locus.

#### B. - Etude génétique de la stérilité d'hybrides

Les hybrides interspécifiques entre *Mus spretus* (*Mus* 3 selon Louis Thaler) et *Mus musculus* (*Mus* 1) qu'on étudie depuis un an ont permis de montrer que 4 (ou peut-être 5) gènes dominants étaient responsables de la stérilité. Chacun de ces facteurs intervient indépendamment et suffit à empêcher la différenciation des cellules sexuelles. Il existe un parallélisme très étroit entre ce type de stérilité et la mutation analogue de la *Drosophile* : *hybrid dysgenesis*.

En étudiant des croisements dans lesquels la femelle est de type *Mus* 3,

on a constaté l'existence d'un effet maternel marqué (et inexplicable) puisque, à de très rares exceptions près, les femelles ne peuvent pas mettre bas (les fœtus mourant *in utero*). Les locus responsables de la stérilité d'hybrides sont actuellement à l'étude et en cours d'isolement. Leur situation sur la carte génétique n'est pas connue, mais un travail de cartographie est en cours avec le groupe de François Bonhomme à Montpellier. D'autre part, plusieurs tentatives d'isolement de mutations « t » ont été faites avec les souris *Mus spretus* sans succès jusqu'à présent.

Une étude analogue à celle qui a été réalisée avec *Mus spretus* est actuellement en cours avec *Mus spicilegus* (souris sauvage du pourtour méditerranéen oriental). Là encore, il semble que les hybrides de cette sous-espèce avec les souris de laboratoire sont stériles chez les mâles (et chez les mâles seulement), mais on ignore si les facteurs en cause sont ou non analogues à ceux qui sont concernés chez *Mus spretus*.

Tous ces facteurs de stérilité, qu'on a appelé Hst-2 et Hst-3, etc., n'affectent pas la viabilité des sujets. En dehors de l'intérêt biologique qu'ils représentent pour la connaissance du phénomène de la spéciation sympatrique, ces mutations sont aussi d'excellents modèles pour l'étude de la différenciation cellulaire car l'étude histologique systématique des gonades que nous avons entreprise sur les descendants des croisements en retour montre qu'il existe clairement trois types de stérilité :

- a) stérilité primaire, pas de cellules germinales ;
- b) stérilité par arrêt au stade métaphase I de la méiose ;
- c) spermiogénèse apparemment normale avec sperme non fonctionnel.

#### C. - Production et utilisation de tératocarcinomes (ou de tératomes) mutants chez la souris

Depuis quelques années, on a établi un programme de détection et d'isolement de tératocarcinomes mutants. Ce programme consiste à rechercher et à isoler des lignées cellulaires nouvelles à partir de souris doublement hétérozygotes pour des allèles du locus T/t (soit T/t<sup>x</sup>, soit t<sup>x</sup>/t<sup>y</sup>). On a ainsi trouvé et isolé deux lignées nouvelles : l'une à partir d'un mâle T/t<sup>w18</sup>, l'autre à partir d'un double hétérozygote t<sup>w32</sup>/t<sup>w5</sup>.

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

Comme on l'a déjà mentionné dans les précédents rapports, les systèmes d'accouplement utilisés permettent d'observer de nouvelles mutations. C'est ainsi qu'on a trouvé :

- m<sup>38</sup> : mutation récessive caractérisée par une décoloration très marquée du pelage ; cette mutation semble originale car elle n'est allélique d'aucune autre mutation déjà connue (étude en cours).

- m<sup>39</sup> : allèle récessif de la mutation « pink-eyed » découvert chez une souris sauvage d'Israël (p<sup>isr</sup>).
- m<sup>40</sup> : mutation intéressant le cervelet, découverte dans la lignée 129 Sv et caractérisée par une modification anatomique des cellules de Purkinje (Cer<sup>4</sup>).
- m<sup>41</sup> : mutation récessive analogue au syndrome « waltzer ».
- m<sup>42</sup> : mutation récessive trouvée dans une lignée consanguine de *Mus spretus* en cours d'établissement, syndrome « waltzer ».
- m<sup>43</sup> : mutation affectant la queue, découverte dans un stock non inbred ; actuellement en cours d'étude.
- m<sup>44</sup> : mutation neurologique au syndrome confus, découverte dans la lignée DBA/2 ; actuellement en cours d'étude.

#### PUBLICATIONS

F. JACOB. — Le tératocarcinome expérimental de la souris. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1979, 163, n° 9, 941-943.

F. GROS, F. JACOB et P. ROYER. — Sciences de la vie et Société. Rapport au Président de la République. La Documentation Française, 1979, Paris.

T. MURAMATSU, P. AVNER, M. FELLOUS, G. GACHELIN et F. JACOB. — Distinctive properties of fucosyl glycopeptides on human teratoma cells. *Somatic Cell genetics*, 1979, 5, 753-761.

M. DAMONNEVILLE, D. MORELLO, G. GACHELIN et M. STANISLAWSKI. — Antibody response to embryonal carcinoma cells in syngeneic mice. *Europ. J. Immunol.*, 1979, 9, 932-937.

L. SORIANO et D. PAULIN. — Immunofluorescence studies on deoxyribonuclease from mouse teratocarcinoma cells during cell differentiation. *J. Embryol. exp. Morph.*, 1979, 54, 37-46.

M. BOCCARA et F. KELLY. — Pluripotent teratocarcinoma Simian virus 40 transformed mouse fibroblasts somatic cell hybrids. In *Modern Trends in Leukemia*, III, R. Neth, R.C. Gallo, P.H. Hofschneider et K. Mannweiler éd., Springer Verlag, Berlin, 1979, 581-585.

T. MURAMATSU, H. CONDAMINE, G. GACHELIN et F. JACOB. — Changes in fucosyl glycopeptides during early post-implantation embryogenesis in the mouse. *J. Embryol. exp. Morph.*, 1980, 57, 25-36.

F. JACOB. — Un livre étranger. Stephen Jay Gould « Ontogeny and Phylogeny », The Belknap Press of Harvard University Press, 1977 (Analyse de François Jacob). *Le Débat*, 1980, 1, 128-129.

P. BRÛLET, C. BABINET, R. KEMLER et F. JACOB. — Monoclonal antibodies against trophectoderm specific markers during mouse blastocyst formation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980, 77, 4113-4117.

J.F. NICOLAS, J. GAILLARD, H. JAKOB et F. JACOB. — A bone-forming cell line derived from embryonal carcinoma cells. *Nature*, 1980, 286, 716-718.

J.F. NICOLAS, R. KEMLER et F. JACOB. — Effects of anti-embryonal carcinoma serum on aggregation and metabolic cooperation between teratocarcinoma cells. *Develop. Biol.*, 1980, 81, 1-13.

J.L. GUENET, H. CONDAMINE, J. GAILLARD et F. JACOB. —  $t^{wPa-1}$ ,  $t^{wPa-2}$ ,  $t^{wPa-3}$  : three new t-haplotypes in the mouse. *Genet. Res., Camb.*, 1980, 36, 211-217.

F. HYAFIL, D. MORELLO, C. BABINET et F. JACOB. — A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell*, 1980, 21, 927-934.

T. MURAMATSU, G. GACHELIN et F. JACOB. — High mannose glycopeptides embryonal carcinoma cells. *J. Biochem. Tokyo*, 1980, 88, 685-688.

F. HYAFIL. — Une molécule très sexiste. *La Recherche*, 1980, 111, 605-606.

M.H. BUC-CARON et P. DUPOUEY. — On the nature of F9 antigenic determinants. *Molecular Immunology*, 1980, 17, 655-664.

G. MARCHAL, G. MILON et J.L. GUENET. — Altered circulation of lymphocytes mediating delayed-type hypersensitivity when primed in  $W^f/W^f$  mice. *Immunology*, 1980, 39, 269-274.

J.L. GUENET. — Les bases génétiques de la compatibilité tissulaire. I. Approche méthodologique. *Sci. Techn. Anim. Lab.*, 1980, 5 (n° 1), 43-48.

J.L. GUENET. — Les bases génétiques de la compatibilité tissulaire. II. Etude génétique. *Sci. Techn. Anim. Lab.*, 1980, 5 (n° 5),

H. CONDAMINE. — Le tératocarcinome de la souris : origine et relations avec les cellules embryonnaires précoces. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 1980, 20, 499-522.

C. BABINET. — A simplified method for mouse blastocyst injection. *Exp. Cell. Res.*, 1980, 130, 15-19.

R. KEMLER. — Analysis of mouse embryonic cell differentiation. In *Fortschritte der Zoologie*, M. Lindauer éd., Wurzburg, 1980 (Symposium « Progress in Developmental Biology »).

C. BABINET et H. CONDAMINE. — Antibodies as tools to interfere with developmental processes. In *Development in Mammals*, M.H. Johnson éd., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 4, 267-304.

D. PAULIN, C. BABINET, K. WEBER et M. OSBORN. — Antibodies as probes of cellular differentiation and cytoskeleton organization. *Exp. Cell. Res.*, 1980, 130, 297-304.

J.L. GUENET. — The genetics of sex determination and differentiation. Les Rencontres de Méribel. Séminaire d'information générale donné aux Arcs, 1980.

D. PAULIN, N. FOREST et H. JAKOB. — Differentiation potentialities expressed by two embryonal carcinoma lines treated with retinoic acid or hexamethylene bisacetamide. Proc. 2nd Intern. Congress on Cell Biology, Berlin, 1980.

J.L. GUENET. — Mutants of the mouse with an abnormal myelination : a review for geneticists. In *Neurological Mutations affecting myelination*. I.N.S.E.R.M. Symp. N° 14, N. Baumann éd., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980, 11-21.

P. CAZALA et J.L. GUENET. — The recombinant inbred strains : A tool for the genetic analysis of differences observed in self stimulation behavior in mouse. *Physiology and Behavior*, 1980, 24, 1057-1060.

H. EISEN, S. HASTHORPE, R. GJERSET, S. NASI et F. KAPPEL. — Distribution and behavior of the chromosomal protein IP<sub>25</sub> *in vivo* and tissue culture. In *In vivo and in vitro Erythropoiesis : The Friend System*. G.B. Rossi éd., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980, 289-296.