

## Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Cette année, le cours a été consacré à l'étude de la différenciation des cellules en relation avec leur position dans l'embryon précoce. Ce problème est au cœur même de la morphogénèse mais reste encore peu accessible à l'expérimentation. La biologie actuelle est avant tout une biologie en une dimension, parfaitement à l'aise dans l'analyse des séquences nucléiques ou protéiques mais non dans celle d'un agencement compliqué dans l'espace. Si la structure d'un animal est en fin de compte déterminée par ses gènes, on voit mal encore comment le génotype se traduit en phénotype, comment une séquence de nucléotides induit la formation de couches de cellules en deux dimensions, couches de cellules qui se replient en trois dimensions de manière très complexe pour donner ses formes à l'animal. Bien évidemment, ce n'est pas directement mais par l'intermédiaire du métabolisme que la séquence nucléotidique modèle la structure de l'organisme. Mais comment les réactions biochimiques peuvent-elles imposer un ordre spatial à l'organisme en développement, cela reste encore du domaine de la pure spéculation.

L'idée que la position d'une cellule dans l'organisme détermine la manière dont va évoluer et se différencier cette cellule n'est pas nouvelle. Elle a été énoncée par Hans Driesch à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle. Reprise par C.M. Child au cours des années 1920, elle a été développée récemment par plusieurs chercheurs et notamment Lewis Wolpert et Alfred Gierer. Différents mécanismes ont été envisagés quant à la manière dont les cellules peuvent recevoir des signaux sur leur position, les interpréter et les convertir en réponses qui ont un sens dans la morphogénèse. Après avoir résumé ces mécanismes possibles, on a discuté les renseignements que peut apporter l'étude de certaines mutations entraînant des modifications morphologiques. L'une de ces mutations met bien en évidence la difficulté du problème. Il s'agit d'une mutation qu'on retrouve chez de nombreux mammifères (chat siamois, tigre blanc, vison perle, rat albinos, etc.) et dont Guillery a montré qu'elle entraîne non seulement une modification de la couleur du pelage

mais aussi une anomalie congénitale du système visuel. Cette anomalie porte sur la position de certaines cellules des ganglions géniculés et sur la manière dont les axones des cellules du ganglion rétinien se dirigent du côté ipsilatéral ou contralatéral vers ce ganglion géniculé. Or chez tous les animaux mutants, la lésion primaire porte sur la structure de l'un des enzymes impliqués dans la synthèse de la mélanine. On voit mal encore la relation qui peut exister entre la synthèse de la mélanine dans les cellules de l'épithélium pigmentaire et l'orientation des axones dans la couche voisine des cellules du ganglion rétinien.

C'est vraisemblablement sur l'œuf et sur les stades précoces du développement embryonnaire qu'il y a le plus de chance de pouvoir analyser les phénomènes de différenciation en relation avec la position des cellules. Au cours de cette année et de l'année suivante, on se limitera à l'étude de deux systèmes :

- le système mosaïque de la drosophile,
- le système à régulation de la souris.

On a commencé par la drosophile.

### *Ovogenèse*

Chaque ovogonie donne un cystocyte primaire qui effectue quatre divisions mitotiques. Sur les 16 cystocytes, l'un va donner l'ovocyte, les quinze autres formant les cellules nourricières. Le cyste s'enveloppe de cellules folliculaires dérivées de l'endoderme. Le complexe ovocyte-cellules nourricières est ainsi entouré d'une couche de cellules folliculaires formant la chambre à œuf.

Au début la chambre croît et s'allonge lentement, l'ovocyte se distinguant de plus en plus des cellules nourricières. Les cellules nourricières donnent progressivement leur matériel à l'ovocyte à travers des ponts intercellulaires. Peu à peu, les cellules nourricières se rétrécissent, puis dégèrent en transférant tout leur contenu à l'ovocyte. Les cellules folliculaires construisent pendant ce temps la membrane vitelline et le chorion. La synthèse des nombreuses protéines du chorion se fait à grande vitesse grâce à un mécanisme d'amplification spécifique des gènes de structure. En fin de compte est ainsi formé un œuf asymétrique, plus pointu en avant, plus rond en arrière, aplati sur sa face dorsale et convexe sur sa face ventrale. Au moment de la fécondation, le pronucleus femelle est installé au 1/4 de la longueur de l'œuf à partir de l'extrémité postérieure et les gránules polaires sont localisés au pôle postérieur. Le reste des composants est distribué de manière à peu près uniforme. Enfin la surface de l'œuf montre des microvilli dont la densité est plus grande dans la région postérieure.

### *Etapas précoces du développement*

La première division du noyau a lieu 15 minutes après la ponte. Elle est suivie par une série de divisions synchronisées, sans formation de membrane faisant ainsi de l'embryon un syncytium. Il y a 13 divisions de clivage dans le syncytium. A la fin de la 8<sup>e</sup> division, les noyaux commencent à se déplacer vers la surface de l'œuf. C'est dans la région postérieure qu'apparaissent les premières cellules ou cellules polaires. Ces cellules qui contiennent le plasmé polaire et les granules polaires, formeront plus tard la lignée germinale. La plupart des autres noyaux restent alignés à la surface de l'œuf où ils effectuent encore 4 divisions. Après quoi se forment les membranes qui se referment sur les noyaux pour donner les cellules du blastoderme. Celui-ci est un feuillet ellipsoïde formé d'environ 6 500 cellules. Après quoi a lieu la gastrulation qui s'accompagne de divers mouvements morphogénétiques avant que n'apparaisse la segmentation de l'embryon. L'éclosion se fait vers la 24<sup>e</sup> heure, donnant naissance à la larve. Pendant sa croissance, celle-ci passe par trois stades successifs, puis se transforme en nymphe qui va se métamorphoser en adulte. Pendant la métamorphose, une grande part des tissus constituant la larve est détruite. La surface de l'adulte est construite à partir d'une série de petits sacs cellulaires présents dans la larve et appelés disques imaginaux.

On a décrit alors les méthodes d'étude du développement propres à la drosophile, notamment la recombinaison mitotique et les chimères gynandromorphes. Parmi les résultats apportés, on a insisté particulièrement sur l'analyse de mutants homéotiques, en prenant comme exemple le locus *bithorax*, et sur les notions récentes de compartiments et de polyclones. Ces notions permettent de se représenter la différenciation progressive d'un organe tel que l'aile comme résultant d'une série de décisions binaires liées à la position des cellules.

On a ensuite discuté les arguments expérimentaux qui permettent d'apporter une réponse à certaines questions.

### *Pendant le clivage, les noyaux sont-ils déjà déterminés ?*

Cette question résume et sous-tend toute une série d'autres questions, et notamment : Dans quelle mesure, pendant le clivage, le destin d'un noyau est-il déjà spécifié en admettant qu'on lui permette de se développer sans perturbation ? Quelle information sur son développement ultérieur un noyau a-t-il déjà reçu à un moment donné ? Dans quelle mesure a-t-il réagi à cette information (s'il l'a reçue), c'est-à-dire a-t-il changé ses activités biosynthétiques ou son organisation épigénétique ? Le noyau a-t-il subi des changements de structures qui peuvent être considérés comme des enga-

gements de développement — c'est-à-dire des changements caractéristiques d'une certaine voie de développement — et qui le distinguent des autres noyaux engagés dans d'autres voies ?

Toute une série d'expériences de transplantation nucléaire ont été effectuées qui mettent en jeu divers marqueurs génétiques. Bien que de telles expériences soient très complexes et l'interprétation des résultats quelquefois ambiguë, elles semblent indiquer que, pendant le clivage, les noyaux restent dans l'état que les embryologistes appellent totipotent.

*Le blastoderme est-il une mosaïque ?*

Les analyses faites avec les gynandromorphes montrent qu'on peut projeter sur le blastoderme des « cartes du destin » des différentes régions. Ce résultat montre que si l'on ne perturbe pas le développement, les cellules du blastoderme s'engageront dans des voies bien définies. Toutefois, il ne prouve pas que les cellules sont déterminées. Rappelons que l'état de détermination d'une cellule est fondé sur un critère empirique : sur le fait que le développement de cette cellule n'est plus modifié si l'on change son environnement.

Pour préciser ce point, de nombreuses expériences ont été réalisées visant à détruire une région bien localisée de l'embryon et à rechercher des lésions entraînées chez l'adulte par ces destructions. Celles-ci ont été effectuées par des moyens très divers : piqûres, brûlures, irradiations X ou UV, sans résultats bien convaincants. Récemment, on a repris ces expériences en utilisant le faisceau d'un laser ultraviolet. Dans ces conditions, des lésions bien localisées de l'embryon, faites juste avant ou juste après la formation du blastoderme, entraînent chez l'adulte des anomalies assez bien définies et reproductibles chez l'adulte. Il est aussi possible de construire des « cartes du destin » du blastoderme, cartes qui s'accordent assez bien avec celles fournies par l'étude des gynandromorphes.

Les résultats d'autres expériences, mettant en jeu des dissociations suivies de réassociations de cellules du blastoderme, ou de transplantation non plus de noyaux, mais de cellules blastodermiques, ou même de recombinaison mitotique conduisent également à conclure que ces cellules sont déjà déterminées, c'est-à-dire engagées dans une direction donnée de différenciation quel que soit leur environnement.

*Existe-t-il des facteurs cytoplasmiques de détermination ?*

Les expériences ainsi rapportées indiquent que d'un côté les noyaux du syncytium sont encore totipotents et de l'autre que les cellules du blastoderme

formées par ces noyaux sont déterminées. Il faut donc admettre l'existence de facteurs cytoplasmiques impliqués dans la détermination des cellules.

Cette notion a pu être confirmée expérimentalement dans le cas des cellules polaires, ces cellules qui se forment les premières dans la région postérieure de l'embryon et qui vont notamment former la lignée germinale. En effet, des expériences d'injection et de transplantation cellulaires assez complexes montrent que le cytoplasme localisé dans la région postérieure de l'œuf et contenant notamment les granules polaires, injecté dans n'importe quelle région d'un autre œuf, y entraîne la formation de cellules polaires qui ultérieurement produiront des cellules germinales fonctionnelles. Pour l'instant, le ou les composé(s) cytoplasmique(s) jouant un rôle dans la détermination des cellules polaires n'ont pu être purifiés.

Cependant, si les expériences d'injection cytoplasmique réussissent dans le cas des cellules polaires, il n'en est pas de même pour les cellules du blastoderme. Dans ce cas, il faut donc faire appel à d'autres hypothèses qui seront discutées dans le cours de l'année prochaine.

F. J.

#### SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires sur les problèmes de différenciation cellulaire.

M. Philippe BRACHET, Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, a exposé la biosynthèse et le mode d'action d'un facteur responsable de différenciation terminale des cellules nerveuses, le *Nerve Growth Factor* (NGF).

M. Louis-Marie HOUEBINE, Maître de recherches à l'I.N.R.A., a donné un séminaire intitulé : « La différenciation de la cellule mammaire : étude du mécanisme d'action de la prolactine et de ses modulateurs.

M. Yves COURTOIS, Directeur de recherches à l'I.N.S.E.R.M., a décrit les aspects moléculaires et cellulaires de la différenciation des cellules épithéliales du cristallin.

M. Jean-François BACH, Professeur à l'Hôpital Necker, a donné une conférence sur les signaux moléculaires de la différenciation intrathymique.

M. Daniel LOUVARD, Chargé de recherches à l'E.M.B.L., a traité des compartiments cellulaires et domaines spécialisés de la surface des cellules épithéliales.

M<sup>me</sup> Sylvie ROBIN-LÉON, Chargée de recherches à l'I.N.S.E.R.M., a présenté ses expériences sur la différenciation des cellules épidermiques en culture.

M<sup>me</sup> Françoise DE VITRY, Maître de recherches au C.N.R.S., et M<sup>me</sup> Annie FAIVRE, Chargée de recherches au C.N.R.S., ont discuté de l'hypothalamus comme modèle d'étude de la différenciation des cellules nerveuses.

M<sup>me</sup> Nicole LE DOUARIN, Directeur de recherches au C.N.R.S., a exposé ses recherches sur le développement du système nerveux périphérique.

M. Michel DARMON, Chargé de recherches à l'Institut Pasteur, a fait le point de recherches récentes sur le rôle de l'environnement extracellulaire dans l'expression des filaments intermédiaires au cours de la différenciation *in vitro* du tératocarcinome.

#### ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Au cours de cette 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. 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 CULTURES CELLULAIRES

(Marie-Hélène BUC, Michel DARMON, Michèle DARMON, Harvey EISEN, Jiri FOREJT, François JACOB, Hedwig JAKOB, Denise PAULIN, Marc VASSEUR)

##### A. - Etude de la différenciation *in vitro* du carcinome embryonnaire (CE) 1003

Les stades les plus précoces du développement du système nerveux sont difficiles à étudier chez l'embryon : au moment de la formation de la gouttière neurale (9<sup>e</sup> jour chez la souris), l'embryon est très petit. Pour aborder ce problème, on a développé un système de différenciation *in vitro* d'une lignée de carcinome embryonnaire : C17 S1-1003 (ou 1003).

Cette lignée possède la propriété de se différencier en neuroépithélium quand les cellules sont cultivées en l'absence de sérum dans un milieu hormonalement défini ; dans un second temps, les cellules neuroépithéliales se différencient en neurones. L'addition de sérum au milieu de culture empêche la différenciation nerveuse, mais de différentes manières selon le moment de l'addition. Si le sérum est ajouté pendant les premières heures qui suivent l'étalement des cellules, aucune différenciation ne se produit ; les cellules restent des cellules de carcinome embryonnaire. Si le sérum est ajouté plus tard (mais avant l'apparition des cellules neuroépithéliales), l'ensemble des cellules se différencie en mésenchyme. Ces expériences montrent que l'environnement extracellulaire conditionne la détermination des cellules. L'étude d'antigènes membranaires suggère que les cellules de carcinome embryonnaire 1003 se différencient tout d'abord en une population de cellules bipotentielle(s) qui se différencie dans un second temps soit en neuroépithélium, soit en mésenchyme. L'addition de FGF au milieu défini permet de maintenir cette population de cellules en culture continue, c'est-à-dire sans que les différenciations terminales nerveuses ou mésenchymateuses ne se produisent.

Cette étude a un double but : 1) *Obtenir des marqueurs* correspondant aux étapes précoces afin de mieux décrire les événements de détermination et de différenciation, 2) essayer d'obtenir des *informations sur l'expression de gènes spécifiques* dans les étapes successives des différentes voies de différenciation.

1) *Protéines des filaments intermédiaires.* Les cellules 1003 indifférenciées ne contiennent aucun autre filament intermédiaire que la vimentine, en faible quantité et non organisée en réseau. Quand ces cellules se différencient en cellules neuroépithéliales, leur contenu en vimentine augmente nettement. Lors de la différenciation de ces cellules en neurones, on assiste à la disparition de la vimentine et à l'apparition séquentielle de deux protéines des neurofilaments (70 K puis 200 K). Les cellules mésenchymateuses contiennent une quantité de vimentine supérieure à celle présente dans les cellules neuroépithéliales et l'organisation du réseau est très différente. L'étude de la régulation de l'expression des protéines des filaments intermédiaires est en cours.

2) *Etude des protéines liées à la chromatine.* L'état d'activation des gènes eukaryotes peut dépendre de *protéines de structure* relativement abondantes, capables de se lier à un gène spécifique pour modifier sa conformation. On a recherché des candidats à cette fonction parmi les protéines nucléaires qui varient au cours de la différenciation de 1003. Des extractions salines fractionnées ont permis de séparer les protéines selon leur affinité pour

l'ADN (élution à 0,35, 1 et 2 M NaCl). Les profils très résolutifs obtenus après électrophorèse quantitative indiquent une remarquable similitude des protéines extraites, à une concentration saline donnée, des cellules 1003 cultivées en sérum (carcinome embryonnaire) ou en milieu défini (précurseurs bipotentiels et neuroépithélium). De même, les cellules mésenchymateuses ont un profil de protéines nucléaires presque identique.

En revanche, des variations quantitatives existent entre deux protéines nucléaires : 2 groupes extrêmes, 2 bandes éluées à 0,35 M NaCl, situées l'une autour de 20 K, l'autre autour de 250 K, sont à peine visibles dans 1003 en sérum ou en milieu défini, et intenses dans les précurseurs mésenchymateux et le mésenchyme. Ces deux protéines pourront éventuellement servir de marqueurs du mésenchyme.

Enfin, une protéine migrant vers 25 K éluée à 0,35 M NaCl, apparaît dans les cellules neuronales. Il s'agit, sans doute de la protéine IP25. Une cinétique d'apparition de cette protéine, étudiée en immunofluorescence, montre en effet que celle-ci n'apparaît que dans les neurones mûrs.

#### B. - *Analyse des lignées de carcinome embryonnaire*

1) *Hybrides obtenus par fusion de différentes lignées CE.* Depuis plusieurs années, toute une série de lignées de cellules CE a été isolée, tant dans notre laboratoire que dans d'autres. Ces lignées présentent fréquemment des propriétés assez différentes de culture, de différenciation, etc. On peut tenter d'analyser ces différences en formant des hybrides entre paires de souches, puis en étudiant les propriétés de ces hybrides. On a ainsi préparé une lignée PCC4 Aza<sup>R</sup> CAP<sup>R</sup> qui est à la fois résistante à l'azauracile et au chloramphenicol (marqueur mitochondrial). Cette lignée fusionnée avec d'autres lignées CE (ou avec des cellules différenciées) permet la sélection d'hybrides tétraploïdes en milieu HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine) plus chloramphenicol. Pour des raisons inconnues, les fusions de cellules PCC4 Aza<sup>R</sup> avec les mêmes lignées, en milieu HAT ne produisent pas de tétraploïdes stables.

Les hybrides obtenus avec les cellules PCC4 Aza<sup>R</sup> CAP<sup>R</sup> d'une part et une des autres souches CE : PCC3, F9 ou LT possèdent le plus souvent les mêmes propriétés que PCC4. En particulier, elles se différencient comme PCC4, aussi bien après traitement par un inducteur comme l'acide rétinolique que dans la formation des tumeurs chez les souris syngéniques.

J. Forejt a isolé à Paris des hybrides entre cellules CE (PCC4 Aza<sup>R</sup> CAP<sup>R</sup>) et thymocytes ou cellules lymphoïdes de souris portant une mutation T Lu-



beck. Il en poursuit maintenant l'étude à Prague, en analysant notamment certains antigènes de surface et les protéines p 63.

2) *Expression d'un gène porté par le chromosome X inactif de cellules CE ♀.* D'après Mohandar, un gène porté par un chromosome X inactif chez des hybrides (cellules humaines × cellules de souris) peut être réexprimé après traitement par la 5-Azacytidine. L'incorporation de cet analogue dans l'ADN décroît la méthylation de celui-ci, ce qui entraînerait la réactivation de segments d'ADN non méthylés.

On a cherché à réactiver ainsi l'hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase (HGPRT) chez des cellules CE de la lignée LT<sub>1</sub> qui possèdent deux chromosomes X, dont un inactif. Une lignée LT<sub>1</sub>Aza<sup>R</sup> (HGPRT<sup>-</sup>) a été isolée puis une lignée résistante au chloramphénicol LT<sub>1</sub>Aza<sup>R</sup>CAP<sup>R</sup>. En milieu HAT, on n'obtient pas ( $< 10^{-7}$ ) de réversion HGPRT<sup>+</sup>. Après traitement par l'azacytidine, en revanche, on obtient, en milieu HAT, des clones avec une fréquence d'environ  $10^{-5}$ . Ces clones ont une activité HGPRT semblable à celle de la souche sauvage LT (à l'exception d'un clone HGPRT<sup>-</sup> capable de se multiplier en milieu HAT). Aucun clone HGPRT<sup>+</sup> n'a pu être isolé de cellules CE témoins (ayant un caryotype XY) et soumises au même traitement.

Toutefois, les cellules HGPRT<sup>+</sup>, isolées à partir de LT Aza<sup>R</sup>CAP<sup>R</sup>, semblent être instables. En milieu contenant de l'azaguanine, une fraction appréciable des cellules se multiplie, qui n'expriment plus d'activité HGPRTase.

Résultat inattendu : parmi toute une série de cellules XX d'origine murine ou humaine, soit CE, soit différenciées, seule la lignée LT<sub>1</sub> produit des clones HGPRT<sup>+</sup> après traitement à l'azacytidine. La cause de cette différence reste totalement inconnue.

### C. - Etude du cytosquelette

Trois réseaux fibreux, microtubules, filaments d'actine et filaments de taille intermédiaire gouvernent de nombreuses fonctions cellulaires, notamment la détermination et le maintien de la forme, l'organisation des compartiments cytoplasmiques, la locomotion et le transport intra-cellulaire ainsi que la redistribution des récepteurs de surface.

Deux aspects complémentaires concernant l'expression et l'organisation des protéines du cytosquelette sont étudiés.

1) *Les filaments intermédiaires (FI) comme marqueurs de la différenciation cellulaire dans l'embryon de souris.* L'acquisition de la polarité cellu-

laire s'accompagne de changements importants dans l'organisation du cytosquelette — polymérisation de l'actine et synthèse des protéines des filaments intermédiaires dans les premiers stades du développement de l'embryon de souris. Avant l'implantation au stade blastocyste, les cellules externes forment un épithélium polarisé, le trophoctoderme, et possèdent un réseau de filaments intermédiaires de cytokératines alors que les cellules internes n'expriment aucune des 5 classes de protéines identifiées à ce jour.

Après l'implantation, les FI des cellules de l'endoderme comme de l'épiblaste sont constitués de cytokératines. L'épiblaste est encore multipotent à ce stade (6 jours). Réinjecté dans la souris, l'embryon de 6 jours peut donner des corps embryoïdes. L'analyse des FI de ces corps embryoïdes montre deux types de cellules comme dans le stade précédent, blastocyste. Lors de l'adaptation des cellules de corps embryoïdes aux conditions de croissance *in vitro*, un nouveau réseau filamenteux est exprimé : il est composé de sous-unités polypeptidiques d'un seul type : la vimentine (PM = 58 k). Des cellules exprimant la vimentine ne sont décelables qu'au jour 8 du développement embryonnaire.

On a étudié également les modifications des filaments intermédiaires au cours de la différenciation des cellules CE induites par l'acide rétinoïque. Suivant les lignées et les traitements, les cellules obtenues produisent une réaction positive pour la kératine, pour la GFA ou la neurofiline. La lignée 1009, à différenciation neuronale, a été étudiée plus particulièrement. Les cellules qui, au départ, contiennent de la vimentine, expriment ensuite la GFA dans une partie des cellules différenciées formées et la neurofiline dans d'autres cellules. Des variants de la lignée 1009 ont été isolés :

- a) des cellules CE qui ne se différencient pas après traitement par l'acide rétinoïque ;
- b) des cellules CE qui ne se différencient qu'en cellules gliales ;
- c) des cellules CE qui ne se différencient plus qu'en cellules neuronales.

2) *Les anticorps spécifiques comme sondes pour l'étude de la structure primaire des filaments intermédiaires.* Les leucémies de Waldenström résultent de la prolifération d'un clone de plasmocytes producteurs d'une immunoglobuline de type IGM. Ces (auto) anticorps monoclonaux sont dirigés contre les protéines du cytosquelette dans 10 % des cas et en particulier contre les protéines des filaments intermédiaires. L'étude de leur spécificité réalisée en collaboration avec les D<sup>rs</sup> K. Dellagi et J.C. Brouet de l'Hôpital Saint-Louis, a montré une réaction contre la vimentine dans les cinq cas étudiés mais contre des épitopes différents. En effet, une réaction croisée avec des protéines d'une autre classe de filament intermédiaire (GFA, desmine, kératines) a pu être démontrée et interprétée comme étant due à la présence

d'une séquence primaire commune de huit acides aminés près de l'extrémité C-terminale. Une autre réaction croisée entre protéines du réseau de filament intermédiaire et protéines des microfilaments est en cours d'identification.

#### D. - *Expression du virus polyome chez les cellules CE*

Dans les cellules CE, l'expression du virus du polyome est bloquée au niveau de la transcription. On a toutefois isolé des mutants de ce virus, sélectionnés sur différentes lignées de carcinome embryonnaire et capables de surmonter ce blocage. Dans des cellules CE infectées par de tels virus, on peut déceler des ARN messagers viraux convenablement polyadénylés, « coiffés » et épissés, engagés activement dans la synthèse des protéines virales. Les mutations portées par ces virus affectent une région non codante, proche de l'origine de la réplication et qui semble indispensable à la mise en route de la transcription précoce, bien qu'étant située à une distance de plus de 200 paires de bases des extrémités 5' des messagers. Ce système permet donc d'envisager l'étude des mécanismes réglant la transcription dans des cellules CE. Plusieurs approches ont été utilisées.

1) *Recherches de protéines nucléaires présentant une affinité spécifique pour la région de la mutation* (en collaboration avec M. Katinka). La région du génome affectée par les mutations de type CE présente une série de séquences symétriques susceptibles de former une structure secondaire de type épingle à cheveux. Nous avons cherché dans des cellules F9, F9 traitées par l'acide rétinolique et dans des cellules fibroblastiques, des protéines susceptibles de reconnaître cette région. Dans la fraction extraite de la chromatine par 0,35 M NaCl, on trouve plusieurs protéines, dont le P.M. s'étage entre 45 k et 95 k, qui fixent avec affinité la région sonde, même en présence de compétiteurs hétérologues ou en présence de fortes concentrations d'héparine. Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de montrer une différence de réactivité entre l'ADN de type sauvage et le mutant. On étudie maintenant les effets de conditions différentes.

2) *Recherche de protéines présentant des affinités particulières pour la région palindromique du DNA*. Les séquences susceptibles de servir de signaux de régulation présentent fréquemment des structures répétées inversées, susceptibles donc de former des structures secondaires. Pour rechercher si de telles séquences pourraient être la cible de protéines régulatrices, on a préparé des fragments d'ADN de souris en épingle à cheveux. En utilisant de tels fragments comme sonde, on a observé des profils protéiques nucléaires différents selon le type de tissu dont ils provenaient. On étudie maintenant

plus spécifiquement les protéines nucléaires de lignées F9 normales ou cultivées en présence d'acide rétinoïque.

3) *Etude de la propagation du virus du polyome dans les cellules CE.* Alors que l'infection de cellules différenciées de souris par du virus polyome est lytique et conduit à la mort cellulaire, des cellules CE infectées à haute multiplicité par des virus mutants se multiplient normalement, à la même efficacité de clonage. En clonant des cellules infectées, on a obtenu des lignées porteuses et excrétaient du virus dans le milieu. Dans ces cellules, on décèle la présence des antigènes précoces et tardifs. Tous les clones sélectionnés à partir de cultures infectées ont une morphologie plus plate que les cellules CE et, au microscope électronique, on peut voir une structuration de l'appareil de Golgi. Les virus se propagent dans ces cellules à l'état d'épisome et peuvent s'intégrer dans le génome.

4) *Recherche dans le génome de la souris de régions homologues aux séquences du polyome affectées par les mutations de type CE.* On peut déceler certaines homologues. On est actuellement en cours d'analyse et de caractérisation de ces séquences qui ne semblent pas être identiques, mais seulement homologues à celles du polyome.

#### E. - Cellules de Friend et protéine HI°

On a poursuivi l'étude de la distribution, la régulation et le rôle de la protéine IP25 chez les mammifères. Cette protéine découverte et caractérisée chez les cellules érythroleucémiques de souris (cellules FL) en cours de différenciation semble être identique à la protéine HI° décrite il y a 10 ans par Chalkey et ses collaborateurs. On a montré que HI° est synthétisée dans les cellules FL très tôt après l'addition d'inducteurs et que sa synthèse s'arrête avant que celle de la globine ne démarre. HI° est associée à la chromatine et spécifiquement aux régions non-transcrites en ARN. Il y a une corrélation entre son apparition et la perte de sensibilité de l'ADN à la digestion par la nucléase de staphylocoque. On a montré également que HI° est associée aux régions « ponts » entre les nucléosomes. Plusieurs questions ont été soulevées par ces résultats :

— Est-ce que HI° est un composant normal de l'érythropoïèse *in vivo*, ou un artefact d'un système transformé *in vitro* ?

— Est-ce que l'on trouve HI° dans d'autres tissus de souris normales et si oui, quelle est sa distribution cellulaire et chromosomique ?

— Est-ce qu'il y a une régulation de la synthèse et du métabolisme de HI° au cours du développement et du cycle cellulaire ?

— HI° joue-t-elle un rôle important dans la différenciation des cellules FL ?

— Est-ce que HI° apparaît lors de la différenciation d'autres types cellulaires *in vitro* ?

— Quel est le rôle de HI° ?

On a essayé de répondre à ces questions en examinant le comportement et les propriétés d'HI° aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. On a continué à étudier la régulation et le rôle de la protéine de chromatine HI° en se concentrant sur deux aspects : la purification et la caractérisation de l'ARN messenger et la comparaison du comportement de la protéine au cours de la différenciation érythroïde normale et leucémique.

1) On a montré qu'HI° est rapidement induite dans les cellules en culture par l'acide butyrique. Cette induction est complète en 10-12 heures. Afin de voir si l'induction se passe au niveau de la transcription, on a préparé de l'ARN de cellules, traitées ou non avec le butyrate. Cet ARN a été traduit *in vitro* et les protéines analysées par immunoprécipitation et par électrophorèse en gel de polyacrylamide. On a montré que le messenger d'HI° est dans la fraction poly A<sup>-</sup> et que les résultats obtenus *in vitro* sont semblables à ce que l'on voit *in vivo*. Il semble donc que l'acide butyrique induit la transcription du messenger d'HI°. Actuellement, on essaie de purifier ce messenger afin d'isoler des clones de cADN dans *E. coli*. Ces clones permettront l'étude approfondie de la régulation *in vivo* et en culture de la synthèse d'HI°.

2) Depuis plusieurs années, on essaie de localiser HI° dans les cellules érythroïdes normales chez la souris. Cela est particulièrement intéressant parce qu'on a trouvé la protéine dans les cellules érythroleucémiques induites à se différencier *in vitro*. Dans ces cellules leucémiques, HI° apparaît en même temps que la spectrine (protéine spécifique de la membrane des érythrocytes) dans les premières 24 heures de l'induction. Or, on a montré que les cellules spectrine<sup>+</sup> des organes hémapoïétiques de la souris normale ne contiennent pas d'HI°, ce qui suggère que : ou HI° est spécifique des cellules érythroïdes transformées, ou sa régulation est différente *in vivo* et dans les cellules transformées. Pour répondre à ces questions, on a examiné les cellules érythroïdes normales aux différents stades du développement de la souris et des colonies érythroïdes formées *in vitro*, à partir de précurseurs normaux de la moelle osseuse de souris.

L'analyse des cellules érythroïdes par immunofluorescence a montré que les seules cellules érythroïdes (identifiées par la présence de la spectrine ou de l'hémoglobine) qui possèdent HI° sont les érythrocytes embryonnaires qui ne perdent pas leurs noyaux et les précurseurs de ceux-ci. On a recherché,

dans des colonies érythroïdes *in vitro*, la présence d'HI° et de la spectrine. Contrairement à toute attente, on a trouvé que, dans ces colonies, il existe des cellules qui contiennent la spectrine et HI°, bien que ces colonies soient dérivées de précurseurs normaux. Néanmoins les cellules les plus avancées ne contiennent pas d'HI°, ce qui suggère que cette protéine est perdue lors de la maturation finale. Il y a deux possibilités pour expliquer le comportement d'HI° dans la lignée érythroïde. a) Il est possible que cette protéine soit, normalement, faite uniquement au cours de l'érythropoïèse embryonnaire et que sa présence dans les cellules adultes soit induite par des conditions anormales qui peuvent exister *in vitro*. Cela serait très spécifique puisqu'une autre protéine embryonnaire (l'antigène F) n'apparaît pas dans les cellules des colonies formées *in vitro*. b) Il est également possible que, dans les conditions d'érythropoïèse normales, HI° soit faite par vagues dans le précurseur qui ne contient pas encore la spectrine et qu'ensuite elle soit diluée par la division cellulaire. Ainsi les cellules spectrine<sup>+</sup> auraient trop peu d'HI° pour qu'on puisse la repérer. Les conditions de culture pourraient soit provoquer une surinduction de l'HI°, soit induire la spectrine plus tôt dans la différenciation.

## II. - GROUPE IMMUNOLOGIE

(Marc FELLOUS, François HYAFIL, Rolf KEMLER)

### A. - Etude des structures membranaires des cellules CE

Depuis quelques années on s'est efforcé de produire des sérums dirigés spécifiquement contre certains composants membranaires en immunisant avec des cellules CE entières. Toute une série de sérums, tant polyclonaux que monoclonaux, a ainsi été préparée. Mais les résultats obtenus ainsi n'ont guère été concluants. Si les sérums ainsi obtenus ont permis de mettre en évidence certains antigènes spécifiques caractérisant les cellules CE, ils n'ont pas permis d'en préciser la nature.

Il a donc semblé nécessaire d'utiliser une autre approche : d'abord analyser les structures membranaires, puis les extraire, les purifier et produire alors des anticorps monoclonaux contre ces molécules purifiées. En utilisant des gels à deux dimensions, on a identifié une série de protéines. Leur isolement est maintenant en cours. Des anticorps monoclonaux seront ensuite préparés contre ces structures, en utilisant le test « Elisa » comme premier dépistage et l'identification de la structure antigénique par transfert des protéines membranaires sur papier de nitrocellulose.

Cette étude se poursuit en collaboration avec Rolf Kemler, qui dirige maintenant une unité d'immunologie à l'Institut Max-Planck à Tübingen.

B. - *L'uvomoruline et son rôle dans l'adhérence des blastomères*

L'uvomoruline est une glycoprotéine de surface impliquée dans la structure compacte des cellules CE et des morula. Un fragment tryptique de l'uvomoruline de PM 84 000 daltons (gp84 = UMt) a été identifié comme une forme hydrosoluble de la cible membranaire d'anticorps « décompactant ».

1) *Un anticorps monoclonal contre l'uvomoruline.* Les splénocytes d'un rat immunisé avec de l'UMt ont été fusionnés avec des cellules de myélome de rat et la présence d'anti-Umt a été recherchée dans les surnageants à l'aide d'un dosage radioimmunologique utilisant de l'UMt radiomarquée à l'I125. Un anticorps monoclonal, DE1, de type IgG2, spécifique pour l'uvomoruline ( $K_D = 2 \times 10^{-8}$  M), a été obtenu de cette façon. Les courbes de fixation de l'IgG DE1 radiomarquée sur les cellules PCC4Aza indiquent l'existence de  $2 \times 10^5$  molécules d'uvomoruline par cellule. En microscopie électronique, ces molécules, révélées en immunoperoxydase indirecte, apparaissent distribuées uniformément sur la surface cellulaire.

2) *Présence sur différents types cellulaires.* Avec le monoclonal DE1 utilisé en immunofluorescence indirecte, l'uvomoruline peut être mise en évidence sur toutes les cellules CE (sauf la lignée 1003, hétérogène). Elle disparaît au cours de la différenciation. Tous les stades du développement embryonnaire possèdent la molécule depuis l'œuf fécondé jusqu'à la morula. Sur le blastocyste, seule la masse cellulaire interne est nettement positive.

3) *Biochimie.* Après solubilisation des cellules CE dans des détergents non ioniques, le monoclonal DE1 permet d'immunoprécipiter une glycoprotéine acide (pI 4,5) de 115 000 daltons. C'est probablement une forme liposoluble de l'uvomoruline dont le fragment UMt est dérivé par digestion tryptique. L'uvomoruline possède un glycoconjugué unique de PM environ 3 500 daltons, neutre, de type complexe et lié en N- sur une asparagine. Ce glycoconjugué ne semble pas impliqué dans les sites antigéniques reconnus par les anticorps mono- ou polyclonaux ni dans les changements conformationnels dépendant du  $Ca^{2+}$ .

4) *Rôle du  $Ca^{2+}$ .* Nous avons vu que le  $Ca^{2+}$  favorise une conformation de l'UMt résistante à la trypsine. Nous avons poursuivi cette étude en montrant que le monoclonal DE1 est sensible aux changements conformationnels de l'uvomoruline et ne reconnaît que la forme prédominante en présence de  $Ca^{2+}$ . Ainsi l'UMt est immunoprécipitée par DE1 : à 0 % en absence de  $Ca^{2+}$  ; à 50 % en présence de  $10 \mu\text{M}$   $Ca^{2+}$  ; et à 100 % en présence de  $0,2 \text{ mM}$   $Ca^{2+}$ . Les courbes de résistance à la trypsine et d'immunoprécipitation par DE1 indiquent l'existence probable de plusieurs classes de sites  $Ca^{2+}$  sur la molécule.

Le  $Mn^{2+}$  et le  $Sr^{2+}$  sont capables de simuler les effets du  $Ca^{2+}$  et favorisent une conformation résistante à la trypsine et reconnue par DE1. D'autres métaux ( $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ) n'ont pas cet effet. Réciproquement, en présence de  $Ca^{2+}$ , le  $La^{3+}$  rend l'UMt sensible à la trypsine et diminue sa reconnaissance par DE1.

Des effets parallèles de ces métaux ont été observés sur la « compaction » : le  $Mn^{2+}$  et le  $Sr^{2+}$  agissent comme le  $Ca^{2+}$  et permettent la compaction ; en présence de  $Ca^{2+}$ , le  $La^{3+}$  provoque la « décompaction » des cellules CE. Il semble donc que l'uvomoruline soit le médiateur des effets du  $Ca^{2+}$  sur la « compaction ».

### III. - GROUPE EMBRYONS DE SOURIS

(Charles BABINET, Philippe BRÛLET, Hubert CONDAMINE, Yi-Sheng XU)

#### A. - *Obtention de sondes moléculaires pour analyser*

*la première différenciation cellulaire dans l'embryon de la souris*

1) *Clonage des gènes codant pour les protéines spécifiques du trophoblaste.* Une banque de cADN a été préparée à partir de mARN extrait de cellules de trophoblaste. Une sonde de cADN a été synthétisée à partir de mARN très purifié et codant pour les protéines voulues. Grâce à cette sonde, une cinquantaine de colonies d'*E. coli* contenant des recombinants a été sélectionnée par hybridation *in situ*. Les mARN complémentaires de chacun de ces plasmides ont été isolés et traduits *in vitro* dans un lysat de réticulocytes. Les produits synthétisés ont été analysés par gel d'électrophorèse à deux dimensions ainsi que par des techniques immunologiques. Les protéines synthétisées à partir de mARN complémentaire à l'insertion d'un des clones étudiés (Rec XVI) sont immunoprécipitées par a) un sérum dirigé contre l'ensemble des protéines des filaments intermédiaires, sérum dont les immunoglobulines spécifiques ont été purifiées par colonne d'affinité ; b) un sérum dirigé contre une protéine purifiée appelée Endo-A (don du D<sup>r</sup> Oshima). Ces protéines synthétisées *in vitro* sont aussi reconnues spécifiquement par l'anticorps monoclonal TROMA-1. En gel d'électrophorèse à deux dimensions, elles ont la migration attendue.

Les populations de mARN présentes dans différentes cellules ont été analysées. Aucune accumulation de mARN dans les cellules totipotentes CE n'a pu être décelée. L'isolement et l'analyse de la structure des clones génomiques correspondant ont été entrepris.

2) *Analyse des séquences de cADN spécifiques de cellules non différenciées.* Une banque de cADN a été construite à partir de mARN isolés



de cellules CE F9. Par hybridation différentielle, un clone a été isolé. Il permet de purifier un ARN de 29 S qui n'est pas décelable dans plusieurs cellules différenciées. Ce cADN décèle de 3 à 5 000 séquences dispersées dans le génome de la souris. Trois clones génomiques insérés dans le phage  $\lambda$  ont été isolés. Deux sont identiques. Il semble que ce soit une part importante de l'ARN 29S qui est répétée dans le génome.

Une analyse fine de la structure des recombinants est en cours.

3) *Analyse d'une protéine nucléaire impliquée dans la formation du blastocyste.* Une protéine abondante et nucléaire est synthétisée dans les cellules de la masse cellulaire interne, mais non dans celles du trophoblaste. Cette protéine a été purifiée. Un anticorps monoclonal a été obtenu. L'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal a été identifié par les techniques de transfert de protéines après fractionnement sur gel en 2 dimensions, ainsi que par immunoprécipitation. Un protocole de détection par immunofluorescence a été mis au point. Des tests ont été développés pour mesurer la quantité de cette protéine dans une cellule donnée.

On cherche maintenant à mesurer les quantités de cette protéine et ses variations en fonction du cycle cellulaire, de la vitesse de réplication de l'ADN et du processus de différenciation cellulaire.

## B. - Etudes d'haplotypes t

L'étude des haplotypes t extraits de souris sauvages a été poursuivie en mettant à profit une observation récente de K. Artzt et L. Silver : la recombinaison semble avoir lieu normalement entre deux haplotypes t (au moins dans une certaine région du chromosome 17) alors qu'elle ne se produit pas, ou à très faible fréquence, entre haplotype t et un chromosome 17 de souris de laboratoire. Cela rend possible, pour la première fois, l'établissement de cartes génétiques des chromosomes t. On a choisi d'étudier la recombinaison qui se produit entre les haplotypes  $t^{w12}$  et  $t^{Lub-1}$ . Dans un premier temps, la ségrégation de quatre marqueurs est déterminée : le centromère, le facteur létal de  $t^{w12}$ , le facteur létal de  $t^{Lub-1}$  et tf, un marqueur de pelage dont une version mutée est portée par l'haplotype  $t^{w12}$ . Les recombinants obtenus (à une fréquence élevée qui pose un problème non résolu) permettent d'affirmer que le facteur létal de  $t^{Lub-1}$  est clairement distinct du facteur létal de  $t^{w12}$ . Ce dernier apparaît très lié à tf, alors que le facteur létal de  $t^{Lub-1}$  semble situé à peu près à mi-distance entre le centromère et tf. Des recombinants où l'haplotype  $t^{w12}$  tf est porté par un chromosome métacentrique ont été obtenus. Ils permettront d'étudier les mêmes recombinaisons entre ce chromosome et n'importe quel

autre chromosome t. Des haplotypes t porteurs de deux facteurs létaux indépendants sont également en cours de caractérisation.

Le problème maintenant abordé est celui de la ségrégation du locus H-2 dans cette expérience. On connaît, depuis quelques années, l'existence d'un déséquilibre de liaison entre H-2 et les porteurs létaux des différents haplotypes t. D'autre part, des résultats obtenus récemment dans le laboratoire de D. Bennett à New York, au cours d'une étude dont le principe est comparable à celle rapportée ici, mais menée avec des haplotypes t différents, semblent montrer que le locus H-2 occupe dans les haplotypes t une position différente de celle qu'il occupe dans les chromosomes 17 de souris de laboratoire. La détermination de l'emplacement H-2 dans les chromosomes t utilisés dans notre expérience revêt donc une certaine importance, qu'elle confirme ou non ce surprenant résultat.

#### IV. - GROUPE GÉNÉTIQUE DE LA SOURIS

(Jean-Louis GUENET)

##### A. - *Etude de certains mutants affectant le développement embryonnaire de la souris*

De nombreuses mutations sont connues chez la souris qui interfèrent avec le développement embryonnaire à des stades variés. La plupart d'entre elles sont apparues spontanément dans les élevages, c'est-à-dire sans qu'il y ait eu d'action mutagène délibérée ; d'autres, au contraire, résultent d'une mutagénèse ; d'autres enfin ont été découvertes dans la nature par l'intermédiaire d'animaux de capture. En général, ces mutations ont une expression dominante à l'état hétérozygote et sont létales à l'état homozygote. Elles ne posent donc pas de problèmes sérieux de maintien.

Toutes ces mutations ont été, jusqu'à une période récente, très peu étudiées en raison de difficultés d'accès à l'embryon. Pour éviter ces difficultés, on a produit des souris tétraparentales en fusionnant un embryon homozygote mutant et un embryon de type sauvage. Ce procédé revient en quelque sorte à greffer des embryons mutants et normalement incapables de se développer *in utero* au-delà d'un certain stade, sur des embryons normaux utilisés comme porte-greffe.

En utilisant des marqueurs génétiques appropriés et relativement simples à reconnaître (albinisme, présence dans les cellules de telle ou telle iso-protéine, etc.), on a pu montrer de manière irréfutable que certaines mutations avaient des effets récupérables (Yellow A<sup>v</sup>, Hairy ears Eh, repeated Epilation Er, Brachyury T, etc.), d'autres non. On a ainsi pu mettre au

point, avec une technique relativement simple (chimères tétraparentales) un procédé de « tri » des mutations de la souris qui constitue à notre avis une étape préliminaire dans le choix du bon matériel.

Parmi ces mutations, certaines pourraient interférer avant les phénomènes de détermination, c'est-à-dire les choix précoces de programmes qui gouvernent les différenciations ultérieures.

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

Les mâles hybrides interspécifiques entre *Mus spretus* (Mus 3 selon Louis Thaler) et *Mus musculus* (Mus 1) que l'on étudie ici depuis quelques années sont stériles. Les femelles, par contre, sont fertiles. On a montré que trois gènes co-dominants sont responsables de cette stérilité, chacun de ces facteurs intervenant indépendamment et étant à lui seul, suffisant pour empêcher la spermatogénèse.

En étudiant des croisements dans lesquels la femelle est de type Mus 3, on a pu remarquer qu'il existe un effet maternel prononcé (et encore inexpliqué) puisque les femelles ne peuvent pas mettre bas et que les fœtus meurent *in utero*. La césarienne avant la naissance permet de sauver les petits ; il s'agit donc d'une anomalie du système de déclenchement de la mise bas. Tous les locus responsables de cette stérilité d'hybrides ont été identifiés et sont en cours d'isolement. L'un d'entre eux, Hst. 2, a même été localisé sur le chromosome 9.

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 soient stériles chez le mâle (et chez le mâle seulement), mais on ignore si des facteurs en cause sont ou non analogues à ceux qui sont concernés chez *Mus spretus*.

Tous ces facteurs de stérilité, dénommés Hst-2, Hst-3, etc., n'affectant pas la viabilité des sujets.

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

On a, cette année, découvert plusieurs mutations spontanées nouvelles :

- m<sup>45</sup> : mutation neurologique intéressant le cervelet. Pas de lésion anatomique décelable ;
- m<sup>46</sup> : obésité génétique (lignée DW) ;
- m<sup>47</sup> : nanisme avec troubles neurologiques ;
- m<sup>48</sup> : mutation neurologique (syndrome cérébelleux).

PUBLICATIONS

R. KEMLER, D. MORELLO, C. BABINET et F. JACOB. — Surface antigens in early embryonic development. *In* « Results and problems in cell differentiation. Differentiation and Neoplasia ». R.G. McKinnell et al. éd. Springer-Verlag, Berlin, 1980, vol. 11, 107-111.

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. No. 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. KEPPEL. — 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.

C. BABINET et G. BORDENAVE. — Chimaeric rabbits from immuno-surgically prepared inner-cell mass transplantation. *J. Embryol. exp. Morph.*, 1980, 60, 429-440.

D. MORELLO, H. CONDAMINE, C. DELARBRE, C. BABINET et G. GACHELIN. — Serological identification and cellular distribution of three F9 antigen components. *J. Exp. Med.*, 1980, 152, 1497-1505.

D. PAULIN, S. ROBINE-LEON et N. FOREST. — Prekeratin-like filaments used as a marker of differentiation of endodermal cells in the mouse teratocarcinoma system. *Biol. Cell.*, 1980, 38, 243-246.

D. PAULIN, N. FOREST et J. PERREAU. — Cytoskeletal proteins used as marker of differentiation in mouse teratocarcinoma cells. *J. mol. Biol.*, 1980, 144, 95-101.

D. BARRITAU, Y. COURTOIS et D. PAULIN. — Biochemical evidence that vimentin is the only *in vivo* constituent of the intermediate-sized filaments in adult bovine epithelial lens cells. *Biol. Cell.*, 1980, 39, 335-338.

F. JACOB. — Liberté ou planification de la Recherche Médicale. *Revue des Deux Mondes*, avril 1981, 20-27.

R. KEMLER, P. BRÛLET et F. JACOB. — Monoclonal antibodies as a tool for the study of embryonic development. *The Immune system*, 1981, 1, 102-109.

R. KEMLER, P. BRÛLET, M.T. SCHNEBELEN, J. GAILLARD et F. JACOB. — Reactivity of monoclonal antibodies against intermediate filament proteins during embryonic development. *J. Embryol. exp. Morph.*, 1981, 64, 45-60.

S. PFEIFFER, H. JAKOB, K. MIKOSHIBA, P. DUBOIS, J.L. GUENET, J.F. NICOLAS, J. GAILLARD, L.G. CHEVANCE et F. JACOB. — Rapid differentiation of a teratocarcinoma line development of cholinergic neurons. *J. Cell. Biol.*, 1981, 88, 57-66.

F. JACOB. — Formation du blastocyste (Colloque entre la Classe des Sciences de l'Académie royale de Belgique et l'Académie des Sciences de l'Institut de France). *C.R. Acad. Sci. Paris*, 28 avril 1981, 59-60.

J.F. NICOLAS, H. JAKOB et F. JACOB. — Teratocarcinoma-derived cell lines and their use in the study of differentiation. In « Functionally differentiated cell lines ». G. Sato éd. Alan R. Liss Publ., New York, 1981, 185-210.

F. JACOB. — Le Jeu des Possibles. Essai sur la diversité du vivant. Fayard éd., Paris, 1981.

F. HYAFIL, C. BABINET et F. JACOB. — Cell-cell interactions in early embryogenesis : a molecular approach to the role of calcium. *Cell.*, 1981, 26, 447-454.

M. FELLOUS, R. BONO, F. HYAFIL et I. GRESSER. — Interferon enhances the amount of membrane-bound  $\beta_2$ -microglobulin and its release from human Burkitt cells. *Eur. J. Immunol.*, 1981, 11, 524-526.

F. HYAFIL. — Glycoprotéines de surface et interactions cellulaires : étude des antigènes HLA et de l'uvomoruline. Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, Paris, 1981.

D. PAULIN. — Cytoskeleton organization in differentiating mouse teratocarcinoma cells. *Biochimie*, 1981, 63, 347-363.

M.J. COULON-MORELEC et M.H. BUC-CARON. — Lipid patterns of embryonal carcinoma cell lines and their derivatives : changes with differentiation. *Dev. Biol.*, 1981, 83, 278-290.

J.L. GUENET. — Les bases génétiques de la compatibilité tissulaire. II. La force des loci impliqués et les exceptions aux lois des transplantations. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 1981, 6, n° 1, 11-15.