

## Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Au cours de cette année, on a poursuivi l'étude des mécanismes permettant de lier la différenciation des cellules et leur position dans l'embryon précoce de la *Drosophile*. On a rappelé tout d'abord les hypothèses envisagées pour expliquer la formation interne de structures polarisées dans des groupes de cellules jusque-là uniformes, ou en apparence uniformes. L'un des mécanismes les plus fréquemment invoqués pour permettre à des cellules de recevoir une information signalant leur position, de l'interpréter et d'y répondre, met en jeu l'établissement de *champs morphogénétiques*. Longtemps restée purement théorique, cette hypothèse a récemment été étayée par toute une série de résultats expérimentaux.

1) Dans la rétine du poulet, Nirenberg et ses collaborateurs ont mis en évidence, à l'aide d'anticorps monoclonaux, l'existence d'une protéine de surface distribuée, dans chacun des yeux, le long d'un gradient symétrique : sa concentration est la plus élevée dans la région dorso-postérieure de la rétine et la plus faible dans la région ventro-antérieure. Les résultats suggèrent que le gradient moléculaire est ainsi formé par un gradient de cellules qui possèdent à leur surface des quantités différentes de cet antigène selon leur position dans la rétine. Le mécanisme qui engendre et maintient un tel gradient reste encore totalement inconnu.

2) Chez l'hydre, Gierer et son équipe ont montré la nécessité d'un gradient chimique pour expliquer les phénomènes de polarité observés au cours de la régénération. En particulier, les expériences de régénération effectuées avec des groupes de cellules désagrégées puis réagrégées montrent que ces cellules conservent le souvenir de leurs positions relatives selon un gradient décroissant de la tête au pied. A partir de quelques dizaines de milliers d'hydres a pu être purifiée une substance de petit poids moléculaire capable de stimuler la division cellulaire et d'induire la différenciation nerveuse des cellules interstitielles. Il s'agit d'un peptide formé de onze acides aminés dont l'extrémité N-terminal est bloquée par un noyau pyroglutamyl. Ce peptide, produit par les cellules nerveuses de l'hydre, est différent des neuropeptides connus.

On peut isoler un peptide très semblable et de fonction inconnue à partir de l'hypothalamus et de l'intestin des mammifères.

3) Dans plusieurs systèmes — notamment le membre d'axolotl et le bourgeon de l'aile de poulet — les résultats d'expériences d'amputation et de greffe ont conduit à invoquer l'intervention de gradients chimiques. Des résultats semblables ont récemment été obtenus par application de dérivés rétiniques. Tout semble se passer comme si pouvait s'établir un gradient de dérivé rétinique imitant en quelque sorte l'hypothétique gradient naturel guidant la morphogenèse.

On a ensuite rappelé les étapes précoces du développement embryonnaire chez la *Drosophile* ainsi que les méthodes d'études propres à cet organisme. Pendant la période de clivage, les noyaux du syncytium ne semblent pas déterminés. En revanche, une fois le blastoderme formé, les potentialités des cellules paraissent fortement restreintes. On peut ainsi tracer sur le blastoderme, une « carte du destin » des différentes régions. A partir de ce moment, dans chaque disque imaginal, la différenciation va procéder par une série de décisions binaires, chaque région se subdivisant en deux compartiments différents, qui à leur tour se subdivisent chacun en deux compartiments, etc.

Comme la détermination semble apparaître avec la formation des cellules du blastoderme, il faut postuler l'existence de facteurs cytoplasmiques jouant un rôle dans la détermination de ces cellules. De tels facteurs cytoplasmiques ont pu être mis directement en évidence, par des expériences d'injection et de transplantation, dans le cas des cellules polaires, ces cellules qui se forment les premières dans la région postérieure de l'œuf et qui contribuent notamment à la production de la lignée germinale. A partir de ces résultats, on a voulu généraliser et postuler la préformation, dans l'œuf, de déterminants cytoplasmiques devant fournir les signaux spécifiques pour la détermination des cellules et l'organisation spatiale de la future mouche.

Cependant, d'une part, on n'est pas parvenu, par des expériences de transplantation, à mettre en évidence l'existence de déterminants cytoplasmiques intervenant dans la détermination des cellules somatiques. D'autre part, toute une série d'arguments s'opposent à cette conception ; et notamment la comparaison entre l'échelle d'organisation dans les compartiments et celle dans l'œuf ou même le blastoderme. Un système en mosaïque fondé sur le modèle des cellules polaires devrait être installé pendant l'ovogenèse. Ce processus aurait lieu dans le follicule, sac formé par une seule couche de cellules. A la surface de l'œuf, la longueur du segment qui donnera naissance, disons à un segment thoracique, correspond, dans la direction antéro-postérieure, à deux cellules folliculaires au plus. S'il existait donc une substance spécifique pour déterminer chaque élément de structure dans le blastoderme, chaque cellule folliculaire devrait produire une substance différente et la transférer dans l'œuf

de manière ordonnée et stable, ce qui semble très improbable. Des problèmes encore plus formidables se poseraient si le fardeau de ces synthèses spécifiques devait être reporté sur la cellule œuf elle-même. Il faut donc admettre qu'à la fin de l'ovogenèse, la cellule œuf contient l'information de position qui sera nécessaire aux cellules du blastoderme pour se déterminer de manière spécifique mais que cette information ne correspond pas à une mosaïque de différentes molécules insérées de manière ordonnée et stable. Des renseignements sur la nature de cette information de position ont été obtenus en perturbant le système par des moyens, soit mécaniques, soit génétiques.

*Perturbations mécaniques.* Elles consistent à centrifuger les œufs ou à les ligaturer à des temps variables et dans des régions variables, puis à préciser l'effet de tels traitements sur le développement de l'embryon. Ce genre de manipulation a été effectué sur les œufs de divers insectes, notamment par Sander. Chez la *Drosophile*, elles ont été réalisées en particulier par Schubiger et par Bownes. De ces expériences, les auteurs ont le plus souvent conclu à l'existence de deux « centres d'organisation », un antérieur, un postérieur, les interactions de ces deux centres déterminant l'ensemble des structures du futur organisme.

*Perturbations génétiques.* Parmi les mutations entraînant les anomalies de morphogenèse, on peut *a priori* attendre deux types au moins : les mutations touchant les gènes exprimés surtout pendant l'ovogenèse ou mutations dites « maternelles » ; et celles touchant les gènes exprimés surtout par le zygote ou mutations « zygotiques ».

Les mutations ainsi isolées peuvent perturber la morphogenèse à trois niveaux :

1) *Mutations perturbant l'organisation d'ensemble de l'embryon.* Il s'agit de mutations maternelles qui modifient les coordonnées spatiales de l'embryon. Ces mutations ont été étudiées en particulier par C. Nüsslein-Volhard. Deux de ces mutations (*bicaudal* et *bicéphalique*) perturbent l'axe antéro-postérieur, une autre (*dorsal*) l'axe dorso-ventral.

*Bicaudal.* Les embryons produits par des mères homozygotes (*bic/bic*) pour cette mutation présentent de fortes anomalies le long de leur axe antéro-postérieur. Chez ces embryons qui n'ont jamais de tête, on trouve une grande variété de phénotypes. Le plus fréquent est celui où la moitié antérieure de l'embryon reproduit en l'inversant selon une symétrie en miroir, la moitié postérieure. On trouve également une variété de phénotypes asymétriques où la région antérieure reproduit, en l'inversant, une part seulement de la région postérieure. Chez ces embryons asymétriques, le nombre des segments antérieurs est toujours plus petit que celui des segments postérieurs. Point inté-

ressant : chez ces embryons, les cellules polaires ne sont jamais dupliquées dans la région antérieure.

*Bicéphalique.* C'est en quelque sorte une mutation réciproque de la précédente. Les embryons issus de mères homozygotes n'ont pas d'abdomen mais présentent une duplication en miroir de la tête et d'un fragment plus ou moins important du thorax. Un aspect intéressant de cette anomalie est sa précocité. On en voit déjà les effets sur la polarité du follicule ovarien : les 15 cellules nourricières forment, non pas un seul groupe au pôle antérieur de l'ovocyte comme chez le type sauvage, mais deux groupes disposés chacun à une extrémité de l'ovocyte.

*Dorsal.* Cette mutation affecte l'axe dorso-ventral. Selon la constitution génétique de la mère, on peut observer soit un effet récessif, soit un effet dominant. Le phénotype récessif consiste en une transformation dorsale de l'embryon tout entier, de sorte que des structures caractéristiques du dos sont formées dans toutes les régions. Le phénotype dominant, moins marqué, est intermédiaire entre le phénotype récessif et le phénotype sauvage de sorte que les structures normalement latérales sont formées sur le ventre.

Il est encore difficile de dire si les effets de cette mutation correspondent à une duplication en miroir de la structure dorsale ou au contraire à une abolition de la polarité dorso-ventrale donnant à l'embryon une symétrie de rotation.

Ces trois mutations entraînent donc un changement intégré de l'embryon, une modification d'ensemble de son organisation spatiale. Pour rendre compte de ces phénotypes, il faut faire intervenir au moins deux types de gradients, un antéro-postérieur et un dorso-ventral, spécifiant la position des cellules et leur dictant leur différenciation.

2) *Mutations perturbant la segmentation.* La subdivision de l'embryon en segments se fait très tôt mais le mécanisme qui sous-tend ce phénomène n'est pas encore compris. Le corps de la larve comprend trois segments thoraciques et huit segments abdominaux. Quoiqu'ils présentent quelques différences, tous ces segments ont des propriétés morphologiques communes, le bord antérieur étant marqué par une rangée de spicules, tandis que le bord postérieur reste nu. L'ébauche de chaque segment provient de la subdivision du blastoderme, un segment étant représenté par une bande transversale de trois à quatre cellules le long de l'axe antéro-postérieur.

Une recherche systématique de mutations modifiant le nombre, la taille ou la polarité des segments a été entreprise par C. Nüsslein-Volhard et ses collaborateurs. Une série de mutations a été obtenue qui touchent 15 locus différents. Ces mutations peuvent être rangées en 3 classes.

*Mutations de polarité.* Le nombre de segments reste normal mais la structure de *chaque* segment est modifiée : par exemple la moitié postérieure de chaque segment a disparu et est remplacée par une duplication en miroir de la moitié antérieure. Des mutations survenant à 6 locus différents entraînent ce genre de phénotypes. Ce sont des létaux récessifs zygotiques.

*Mutations alternées.* Disparition d'un segment sur deux. Dans cette classe de mutations, la frontière délimitant un segment a disparu dans un segment sur deux. Par exemple, une de ces mutations abolit la bande de spicules de T1, T3, A2, A4, A6 et A8. Une autre abolit la bande de T2, A1, A3, A5 et A7. Dans ces deux cas, les larves ont la moitié du nombre normal de segments. Tout se passe comme si, à une étape du développement normal, l'embryon était organisé en unités répétées dont la longueur correspond à l'ébauche de deux segments, chacune de ces ébauches étant secondairement subdivisée.

*Mutations entraînant des déficiences.* Dans les deux premières classes, les mutations obtenues entraînaient une modification répétée, à intervalle fixe, le long de l'axe antéro-postérieur. Dans cette troisième classe, au contraire, les mutations causent la disparition de plusieurs segments adjacents. L'une de ces mutations, par exemple, fait disparaître tout le thorax et les segments antérieurs de l'abdomen. Une autre entraîne l'absence des segments méso- et métathoraciques. Une troisième enfin ne laisse que le premier et le huitième segment de l'abdomen, les segments A2 à A7 ayant disparu.

C'est donc la transition d'un champ morphogénétique unique à une série répétée de sous-champs homologues plus petits qui peuvent modifier les mutations à l'un des 15 locus perturbant la segmentation. On a discuté ensuite les hypothèses qu'on peut formuler sur cette transition d'après les mutations observées.

3) *Mutations homéotiques.* Ce qui est modifié par ce type de mutation, ce n'est ni le plan général de l'organisme, ni le nombre de segments ; c'est le sort embryologique d'un ou plusieurs de ces segments. Par exemple, au lieu de produire une antenne, le disque imaginal correspondant formera une patte chez le mutant *aristapedia*.

C'est le locus *bithorax* qui a été le plus étudié, grâce en particulier aux travaux d'E.B. Lewis. On a décrit en détail les différents types de mutations liées au locus *bithorax*. On a discuté ensuite les interprétations possibles de ces mutations, en relation notamment avec l'hypothèse dite des compartiments et des polyclones. Les gènes du locus *bithorax* correspondent à ce que A. Garcia-Bellido a appelé *gènes sélecteurs*, c'est-à-dire des gènes qui choisissent un programme de différenciation en activant une série de gènes de structure. L'activation des gènes sélecteurs eux-mêmes dépendrait de gènes régulateurs selon le modèle de synthèse induite de  $\beta$ -galactosidase chez

*Escherichia coli* : des gènes situés hors du locus bithorax détermineraient la mise en place d'un gradient de répresseur — ou d'inducteur — le long de l'axe antéro-postérieur de l'organisme. La sensibilité différentielle des gènes bithorax à cette substance entraînerait l'activation progressive de ces gènes le long du corps de l'animal.

On voit ainsi qu'à tous les niveaux de l'analyse génétique — mise en place des axes dans l'œuf, processus de segmentation et spécification du développement pour chaque segment — les résultats obtenus montrent l'existence de mécanismes assurant le couplage entre la position d'une cellule et l'expression de ses gènes. Dans l'état actuel des connaissances, on est conduit, dans chaque cas, à postuler l'intervention d'un ou de plusieurs gradients. Bien entendu, on n'a pas la moindre indication sur la nature chimique de ces gradients hypothétiques.

F. J.

#### SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires sur la structure et le fonctionnement du génome.

M. Francis QUETIER, Professeur à l'Université de Paris-Sud, a fait un exposé sur l'organisation et l'expression du génome mitochondrial des plantes.

M. Bernard DUJON, Maître de recherches au C.N.R.S., a décrit la structure et la fonction des introns des organelles.

M. Harvey EISEN, Maître de recherches au C.N.R.S., a rendu compte de la régulation du type sexuel chez *Saccharomyces cerevisiae* (le modèle de la cassette) et de la régulation de l'expression des antigènes de surface chez les Trypanosomes africains.

M. Roland BERGER, Maître de recherches au C.N.R.S., a discuté des remaniements chromosomiques associés aux leucémies humaines.

M. Philippe KOURILSKY, Maître de recherches au C.N.R.S., a fait le point sur la structure et la diversité des gènes H-2 chez la Souris.

M. Maurice HOFNUNG, Maître de recherches au C.N.R.S., a décrit la régulation de la stabilité et de l'instabilité génétique chez les bactéries.

M. Alain SARRASIN, Maître de recherches au C.N.R.S., a traité de la réparation de l'ADN chez les Mammifères.

M. Michel COHEN SOLAL, Maître de recherches à l'I.N.S.E.R.M., a présenté un exposé sur les hémoglobines humaines (structure des gènes normaux et anomalies en pathologie).

M. Jean-Claude BREGLIANO, Professeur à l'Université de Clermont-Ferrand II, a donné une conférence sur les séquences génétiques mobiles et la variabilité génétique.

#### 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. 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 utilisant des techniques différentes.

#### I. ANALYSE DES PROPRIÉTÉS DES CELLULES DE CARCINOME EMBRYONNAIRE

(Jean-Vianney BARNIER, Olivier BENSAUDE, Anita DIU, François JACOB, Hedwig JAKOB, Catherine MARLE, Michel MORANGE, Marc VASSEUR)

Ces cellules, qui forment les cellules souches des tératocarcinomes, ont des propriétés très semblables à celles des cellules pluripotentes de l'embryon précoce. C'est donc sur elles que viennent s'articuler l'étude de l'embryon et celle du tératocarcinome.

##### A. Protéines dites « de choc thermique »

On sait que, chez les eucaryotes, une même classe de protéines très conservées voient leur synthèse devenir prépondérante quelques heures après une « agression » telle qu'un choc thermique, un bref traitement à l'arsénite, etc. Il était couramment admis que les protéines impliquées dans cette synthèse induite ne dépendaient ni de l'espèce (levure, plante ou animal), ni du type cellulaire. On a cependant montré que trois des principales protéines dites

« de choc thermique » sont synthétisées à haut niveau par les cellules CE. En fait, les trois protéines 89 Kd, 70 Kd et 59 Kd représentent, après l'actine, les plus importantes synthèses protéiques de ces cellules. De plus, la synthèse des protéines 89 Kd et 59 Kd n'est pas stimulée par un choc à l'arsénite, contrairement à ce qu'on observe avec des fibroblastes ou des cellules dérivées du sac vitellin. En outre, quand les cellules CE se différencient, on observe une décroissance de la synthèse spontanée de ces protéines qui redeviennent inductibles par l'arsénite.

Le réexamen des données publiées dans la littérature sur les synthèses protéiques par les stades précoces de l'embryon de souris semble montrer que les mêmes protéines de choc thermique sont effectivement synthétisées aux premières étapes du développement. Il importe donc maintenant de préciser les conditions de cette synthèse et d'analyser le mécanisme de leur régulation.

*B. Expression d'un gène porté par le chromosome X inactif de cellules CE provenant d'une souris femelle*

On a montré l'année dernière qu'en traitant des cellules CE LT Aza<sup>R</sup> — déficientes en hypoxanthine-phosphoribosyl transférase (HGPRT<sup>-</sup>) et provenant d'embryons parthénogénétiques de souris LT — avec la 5 azacytidine, on peut obtenir avec une fréquence d'environ 10<sup>-4</sup> des clones exprimant une activité HGPRT. Comme les cellules initiales LT Aza<sup>R</sup> ne présentent, par dosage chimique, aucune activité HGPRT, comme la fréquence de réversion est inférieure à 10<sup>-8</sup> et comme ces cellules ont un de leurs deux chromosomes X inactifs, il semble bien que l'activité HGPRT obtenue après traitement à l'azacytidine soit due à l'expression du gène porté par le chromosome inactif. Cette interprétation est donc étayée par le fait que le même traitement à l'azacytidine ne produit pas de clones HGPRT<sup>+</sup> sur des cellules HGPRT<sup>-</sup> ne contenant qu'un chromosome X, soit XY (comme PCC7-S1009), soit XO (PCC3 Aza<sup>R</sup> ou PCC4 Aza<sup>R</sup>). En revanche une lignée de fibroblastes de souris provenant d'une souris femelle, transformée par SV40 et ayant un chromosome X inactif, produit des clones HGPRT<sup>+</sup> après traitement à l'azacytidine.

Les fréquences de « réactivation » varient d'une lignée à une autre et se situent aux environs de 5 × 10<sup>-3</sup>. Cette fréquence dépend des concentrations d'azacytidine utilisées (de 2 à 8 μM) et du temps d'expression laissé aux cellules après le traitement à l'azacytidine et avant d'appliquer la sélection pour les cellules HGPRT<sup>+</sup> en milieu HAT. La multiplication cellulaire semble en effet nécessaire pour que se réexprime le gène. Les fréquences les plus élevées sont obtenues lorsque le milieu sélectif HAT n'est utilisé que 48 ou 72 heures, soit 4 à 6 générations, après traitement à l'azacytidine.

Ces résultats s'accordent à l'hypothèse d'un effet de l'azacytidine sur la méthylation de l'ADN. L'étude de cette méthylation sur le gène de l'HGPRT a été entreprise avec P. Avner. On dispose pour cela d'une sonde de cADN de l'HGPRT de souris provenant du laboratoire de T. Caskey. La distribution des groupes méthyl sur l'ADN de l'HGPRT dans une série de lignées CE et de clones « réactivés » est en cours d'analyse.

Alors que les souches d'origine sont tumorigènes, certains des clones « réactivés » ne le sont plus. On recherche actuellement si ces derniers clones peuvent ou non former des tumeurs quand les souris-hôtes ont été irradiées. La modification du caractère tumorigène a peut-être été causé par le traitement à l'azacytidine indépendamment de l'action sur HGPRT.

### C. Etude des mutants du virus polyome capables de se multiplier sur les cellules CE

La mutation PyEC, permettant au polyome de se développer sur des cellules de carcinome embryonnaire, n'est pas dominante en *trans* : lorsqu'on coinfecte des cellules avec un virus sauvage et un virus muté, seul le virus muté se multiplie. En reconstruisant un génome viral contenant côte à côte une région sauvage et une région mutée, on a observé que le caractère muté (croissance sur cellule CE) est dominant sur le caractère sauvage.

On a cherché si existaient, dans le génome de souris, des séquences homologues de la « région d'intensification » (enhancer) du polyome. A partir d'une banque génomique propagée dans le phage  $\lambda$ , on a obtenu 40 clones qui hybridait avec la séquence d'intensification du polyome. Les hybridations ont été effectuées dans des conditions permettant de déceler des homologies partielles. Le signal d'hybridation de ces clones est très faible et devient nul lorsqu'on augmente la température de lavage de 60 à 65 °C. Un des clones a été plus étudié. Il contient une région présentant une homologie évaluée à 40 % du fragment Pvu-II-4 du polyome.

Depuis le début des expériences d'infection des cellules CE par des mutants de polyome, il est apparu que la sensibilité des cellules au virus n'était pas constante. Cette sensibilité peut varier selon la densité des cellules, selon le temps séparant le repiquage de l'infection ou de manière apparemment aléatoire. En utilisant une lignée de cellules F9 clonées, chroniquement infectées par PyEC F9-1, on a observé que :

- 1) le pourcentage de cellules exprimant le virus dans la population varie de manière cyclique entre 5 % et plus de 50 % ;
- 2) toutes les cellules de la population, même celles qui sont négatives pour l'expression du virus, contiennent le génome viral ;
- 3) sur une population n'exprimant le virus qu'à un pourcentage de 10 %,

une série de surinfection à des multiplicités très élevées n'a aucun effet sur ces cellules : la fraction de cellules positives n'augmente pas ;

4) dans ces populations en infection chronique, l'ADN viral se trouve à la fois sous forme intégrée et sous forme épisomique ;

5) si on clone cette population en infection chronique sur des lamelles permettant de procéder directement à des immunofluorescences sur les clones obtenus, on voit que le caractère positif se distribue de manière statistique : clones entièrement positifs, ou avec quelques cellules positives, et faible pourcentage (moins de 10 %) de clones entièrement négatifs.

De ces expériences, on peut tirer la conclusion que les cellules F9 doivent alterner d'un état permissif à non permissif, que la même cellule peut être sensible ou non. Cette métastabilité pourrait être le fait d'un système ou d'un facteur qui gouvernerait l'expression de certains gènes et dont la propre régulation serait variable.

## II. ÉTUDE DE LA PREMIÈRE DIVERSIFICATION CELLULAIRE CHEZ L'EMBRYON DE SOURIS

(Philippe BRÛLET, Mourad KAGHAD, Nadine PEYRIERAS)

Après fécondation, l'embryon se segmente rapidement pour former la morule. Au 4<sup>e</sup> jour, quand l'embryon est constitué de quelque 30 cellules, apparaît la cavité blastocélique et se creuse un blastocyste formé de deux types cellulaires différents : une couche externe ou trophoblaste et une masse de cellules internes. Ces deux types de cellules diffèrent tant par leurs propriétés que par leurs devenir embryologiques. C'est le mécanisme de cette première différenciation liée à la position des cellules dans l'embryon qu'on cherche à préciser. Une telle analyse exige :

— d'une part, de disposer d'excellents marqueurs biochimiques ou immunologiques, éventuellement repérables sur un seul blastomère ;

— d'autre part, de pouvoir interférer, de manière relativement sélective, avec ce processus de développement.

### A. Etude de marqueurs spécifiques

1) *Trophoblaste*. Au cours des années précédentes, il a été montré que les cellules du trophoblaste, mais non celles de la masse cellulaire interne, contiennent un réseau de filaments intermédiaires. Une série d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces protéines, de type kératine, ont été préparés : grâce à ces anticorps, le mARN spécifiant la structure de la principale protéine de ces filaments a été purifié, recopié en cADN et inséré dans un plasmide.

Grâce à ce clone de cADN, quatre recombinants génomiques insérés dans des phages  $\lambda$  ont été isolés à partir de deux banques indépendantes d'ADN de souris. Le nombre de gènes déterminant la structure de la protéine reconnue par l'anticorps monoclonal TROMA-1 (et la présence d'éventuels pseudogènes) n'est pas connu exactement, mais ce nombre semble être petit, de l'ordre de 1 ou 2. Il s'agit maintenant d'identifier et de préciser la structure du promoteur et des régions régulatrices de ce gène afin d'accéder au mécanisme de son expression différentielle.

## 2) *Masse cellulaire interne*

a) *Analyse d'une protéine nucléaire.* Une protéine nucléaire est synthétisée en quantité beaucoup plus importante par les cellules de carcinome embryonnaire (CE) (cellules souches du tératocarcinome et utilisées comme substitut des cellules de la masse interne) que par les cellules de trophoblastome (également dérivées d'un tératocarcinome et utilisées comme substitut des cellules du trophoctoderme). Un anticorps monoclonal, préparé contre cette protéine, permet de mesurer la quantité de cette protéine présente dans une cellule donnée. On a ainsi montré que la quantité de cette protéine varie selon les types cellulaires. Elle est présente en abondance dans les cellules CE, mais sa diminution n'est pas fonction du seul processus de différenciation, ni de la vitesse de replication de l'ADN. Il est probable que cette protéine est impliquée dans la phase S du cycle cellulaire.

b) *Clone de cADN décelant un ARN spécifiquement transcrit dans les cellules CE.* L'année précédente, à partir d'une banque de cADN préparée à partir de mARN provenant de cellules CE, on a isolé un clone de cADN qui s'hybride avec le mARN des cellules CE mais non avec le mARN des cellules trophoblastiques.

Cette sonde d'environ 300 bases a permis de repérer un ARN d'environ 6 kilobases dans les cellules CE, ARN qu'on ne peut déceler dans une série de lignées cellulaires différenciées. Cette séquence est dispersée et moyennement répétée (1 000 à 3 000 fois) dans le génome de la souris.

La séquence de la sonde a été établie. Elle contient deux répétitions palindromiques inversées. A l'aide d'un ordinateur, on cherche à comparer cette séquence à celles des ADN déjà répertoriés.

On essaie maintenant d'obtenir un cADN contenant la région 5' de l'ARN de 6 kilobases, grâce à une purification de l'ARN et à une amorce spécifique de la transcriptase (avec la sonde). Un tel cADN devrait aider à isoler le gène spécifiquement transcrit dans les cellules CE.

L'analyse d'un clone génomique a été entreprise. Ce clone contient 2 fragments hybridant avec la sonde cADN. L'étude des hybrides au microscope électronique a été entreprise.

C'est donc à un transposon ou à un rétrovirus que fait penser l'ensemble de ces données. Toutefois, on n'a pas pu encore déceler la présence de cet ADN sous forme non intégrée.

### B. *Interférence avec la différenciation*

Lors du stade 8 cellules, l'embryon subit une transformation spectaculaire et prend une forme compacte dans laquelle les unités cellulaires deviennent difficiles à discerner. Au cours des années précédentes, on a montré que les fragments monovalents Fab d'immunoglobulines contenues dans un sérum de lapin dirigé contre les cellules CE empêche réversiblement la formation de cette structure compacte.

La molécule servant de cible à ces anticorps, ou *uvomoruline*, a été purifiée à partir de membranes de cellules CE traitées à la trypsine. Ce fragment tryptique est une glycoprotéine de PM 84 K qui peut exister sous deux formes. En présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , il est résistant à une digestion plus poussée par la trypsine et immunoprécipité par un anticorps monoclonal préparé par immunisation de rats avec ce fragment tryptique d'uvomoruline. En absence de  $\text{Ca}^{2+}$  au contraire, ce fragment est digéré par la trypsine et n'est pas précipité par l'anticorps.

Le rôle de l'uvomoruline dans la compaction peut être mis en évidence par des expériences d'agrégation de cellules CE. Les cellules PCC4 Aza<sup>R</sup> dissociées puis agitées à 37° reforment rapidement des agrégats qui, en 10 à 30 mn, acquièrent des structures tri-dimensionnelles. Dans ces structures, les cellules sont étroitement associées, ce qui laisse penser qu'il s'agit d'un phénomène analogue à la « compaction ». Ce processus dépend du traitement effectué pour dissocier les cellules. En particulier tout traitement connu pour détruire l'uvomoruline à la surface des cellules — par exemple 10 µg de trypsine en présence d'EGTA — empêche les cellules PCC4 Aza<sup>R</sup> d'être compétentes pour effectuer cette réaction : les cellules restent dissociées. Au contraire, les traitements laissant intacte l'uvomoruline — EGTA sans trypsine ou trypsine en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  — laissent aux cellules la compétence de se réagréger en structures compactes.

### III. RECHERCHE D'UN SYSTÈME DE DIFFÉRENCIATION IN VITRO (Marie-Hélène BUC, Michel DARMON, Michèle DARMON, Bernard EDDE, Denise PAULIN)

Pour l'étude de nombreux problèmes, l'embryon, notamment dans les stades du développement qui se poursuivent après l'implantation, représente un matériel difficile à manier. Certains de ces problèmes peuvent être étudiés

avec profit sur l'un des systèmes de différenciation *in vitro* dérivés du tératocarcinome. Deux de ces systèmes ont été mis à l'étude.

*A. Analyse de la différenciation de la lignée 1003 de cellules CE sous la dépendance de l'environnement extracellulaire*

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'action de l'environnement ne dépend pas seulement de facteurs solubles (facteurs sériques, FGF), il dépend aussi de facteurs insolubles (molécules d'attachement). Ainsi la culture de 1003 en milieu défini sur un substrat de fibronectine permet la formation de tissu nerveux mais pas de tissu musculaire alors que sur laminine ces deux tissus peuvent être obtenus. Les myotubes obtenus peuvent être colorés avec un antisérum dirigé contre la myosine musculaire embryonnaire.

Si on cultive 1003 dans un milieu défini contenant du FGF (50  $\mu\text{g/ml}$ ), il est possible de repiquer les cultures pendant plus de 20 générations. Le phénotype de ces cultures est apparemment indifférencié. En effet, quand ces cellules sont repiquées en absence de FGF, leur croissance se ralentit et la plupart des cellules se différencient en neurones. Toutefois, si on repique les cellules dans un milieu contenant du sérum, elles se différencient en mésenchyme embryonnaire. Ces cultures continues en FGF diffèrent donc de celles obtenues avec du sérum puisqu'elles contiennent des cellules « condamnées » à se différencier bien que non-déterminées.

La chronologie des modifications du milieu joue aussi un rôle dans le choix des voies de différenciation. Ainsi l'addition précoce de sérum à des cultures de 1003 en milieu défini aboutit à la formation de mésenchyme embryonnaire, alors que l'addition tardive aboutit à la formation de tissu fibroblastique. Le mésenchyme embryonnaire se caractérise par les propriétés suivantes : formation de tumeurs type blastème-embryonnaire, antigène de surface NG2, non-réponse à un traitement par la 5-azacytidine. Les fibroblastes se définissent par les propriétés suivantes : formation de fibrosarcomes, absence de l'antigène NG2, formation de tissu musculaire après

traitement par l'azacytidine et de tissu graisseux après traitement par la dexaméthasone. Ce système se prête à une série d'analyses biochimiques, immunologiques ou moléculaires.

1) *Etude biochimique de la différenciation de la lignée 1003.* Cette étude a porté sur les filaments intermédiaires, les antigènes de surface et le métabolisme des neuromédiateurs. Il est possible de distinguer plusieurs étapes dans la différenciation nerveuse de 1003 : on observe tout d'abord la formation de cellules neuroépithéliales caractérisées par leur capacité à former des rosettes, par la présence de canaux à sodium vératridine-sensibles et par la présence de vimentine. Les cellules neuroépithéliales se transforment ensuite en neurones post-mitotiques. Au cours de cette transformation, la vimentine disparaît, la protéine des neurofilaments 70 K apparaît ainsi que l'antigène de surface NG. Enfin, la protéine des neurofilaments 200 K est synthétisée de même que l'histone H1° (IP25).

La plupart des neurones dérivés de 1003 sont probablement cholinergiques si l'on en juge par l'activité relativement élevée de la choline-acétyltransférase (0.55 nmol Ach/h par mg protéine). Il est possible en outre de déceler de l'acétylcholine dans le milieu de culture. Toutefois, de rares neurones ( $\sim 1/1\ 000$ ) sont de type catécholaminergique puisqu'on peut les colorer spécifiquement avec des anticorps anti-tyrosine-hydroxylase.

2) *Etude des protéines du cytosquelette.* La comparaison de gels d'électrophorèse en deux dimensions permet de repérer certaines des modifications se produisant lors du passage d'un type cellulaire à l'autre. Dans la différenciation neuronale des lignées CE 1003 et 1009, plusieurs groupes de protéines apparaissent clairement modifiés. Ces modifications touchent :

- les filaments intermédiaires,
- la tubuline,
- une protéine de poids moléculaire 47 000, et de fonction encore inconnue mais dont l'abondance rappelle celle des protéines du cytosquelette.

a) *Protéines des filaments intermédiaires.*

Les protéines constituant les filaments intermédiaires font partie d'une famille multigénique dont l'expression séquentielle caractérise un état de différenciation donnée. Au cours du développement embryonnaire de la souris sont successivement exprimées : dans le trophoctoderme et l'endoderme certaines protéines de la famille des kératines (3-4 j) ; dans les cellules du mésoderme (6 j), la vimentine ; puis dans le tube neural (8 j), les neurofilaments. Ces polypeptides représentent dans le tissu spécialisé jusqu'à 10 % des protéines totales.

Dans le cas où la différenciation résulterait d'un choix binaire, on doit envisager la possibilité d'un précurseur cellulaire commun, ce précurseur passant par une phase bipotentielle transitoire avant de donner naissance à deux classes de cellules. Cela conduit à rechercher une coexpression, dans le précurseur, de marqueurs spécifiques de l'une et l'autre des lignées filles. Au cours de la différenciation de cellules de carcinome embryonnaire 1003, l'expression de deux protéines appartenant à la famille des filaments intermédiaires, la vimentine et la protéine 70 K, a été observée et analysée.

La coexistence de ces deux protéines a été retrouvée dans l'embryon de souris au jour 8. A ce stade, en effet, on peut mettre en évidence des cellules doublement marquées par les antigènes spécifiques anti-vimentine et anti-protéine 65 K, alors que les neurones matures n'expriment que la protéine 70 K. La coexistence de ces deux protéines ne donne évidemment aucune indication ni sur le niveau de leur expression, ni sur l'activité de gènes correspondants. Pour résoudre ce problème, on a isolé les messagers poly A<sup>+</sup> de cerveau de souris afin de préparer des sondes spécifiques correspondant à la séquence vimentine ou neurofilament 70 K.

Les neurofilaments de souris ont été purifiés et analysés en gels à une ou deux dimensions : ils sont constitués de trois protéines de masse molaire 215 000, 150.000 et 70.000 et de points isoélectriques 5,8, 5,3 et 5,2. L'ARN poly-A<sup>+</sup> total et les polysomes totaux de cerveau ont été purifiés et les produits recherchés dans deux systèmes de traduction : le lysat de réticulocyte et l'oocyte de Xénope. La traduction de l'ARN poly-A<sup>+</sup> dans l'oocyte de Xénope permet de repérer un certain nombre de protéines nouvelles par rapport au témoin. L'identification de ces protéines a été effectuée. La traduction de l'ARN-poly-A<sup>+</sup> est toutefois moins efficace dans le lysat de réticulocyte. Il en est de même de la traduction des polysomes dans le système acellulaire de réticulocytes. Ce système permet cependant de déceler des protéines qui migrent en gel à deux dimensions aux mêmes emplacements que l'actine (MM = 43.000, pHi = 5,6), la tubuline (MM = 55.000, pHi = 5,4), la GFAP (MM = 51.000, pHi = 5,7) et les protéines des neurofilaments (MM = 65.000, pHi = 5,2 et MM = 150.000, pHi = 5,3).

Un anticorps monoclonal réagissant avec quatre classes de filaments intermédiaires (vimentine, desmine, kératine A et GFA) a confirmé l'homologie structurale de ces filaments et précisé que la reconnaissance de la séquence réactive devait se faire dans une région correspondant à une structure en  $\alpha$ -hélice.

#### b) *Tubuline.*

Une isoforme dite  $\beta'$  de la tubuline a déjà été identifiée dans le cerveau de souris ainsi que dans les cellules de neuroblastomes. On a étudié systé-

matiquement la distribution de cette protéine dans une série de lignées établies ainsi que dans les tissus de souris adultes. Cette étude a montré que  $\beta'$  est exprimée uniquement dans les tissus et dérivés neuronaux analysés. Comme  $\beta'$  n'est exprimée ni dans les cultures primaires de cellules gliales, ni dans le gliome C6 ainsi que l'ont montré Moura Neto et Prochiantz, il semble bien que  $\beta'$  soit un marqueur neuronal strict.

c) *Protéine p 47.*

De la même manière, la protéine p 47 est caractérisée comme un marqueur du système nerveux qui semble commun à la glie et au neurone mais qui n'est pas exprimée dans les dérivés de la crête neurale : phéochromocytome PC12n, mélanome B16, neuroblastome NIE115. La protéine p 47 est l'une des dix protéines majeures du cerveau de souris adulte. Elle est déjà exprimée au 13<sup>e</sup> jour de la vie embryonnaire et sa synthèse augmente tout au long du développement pré- et post-natal. Il faut noter que p 47 est présente à l'état de traces dans des cellules CE tout au moins dans les lignées 1003, 1009, PCC4. On a clairement montré qu'elle était différente de plusieurs autres marqueurs neuronaux : protéines de neurofilaments, GFA, éolase neuro-spécifique. Cette protéine ne semble pas encore avoir été décrite.

Comme  $\beta'$ , p 47 semble impliquée dans une étape de différenciation qui précède de peu l'extension des neurites. En effet, les modifications liées à ces protéines commencent à apparaître vers le 5<sup>e</sup> jour de la culture lorsque les cellules 1003 s'organisent en neuro-épithélium, stade auquel on n'observe pratiquement pas encore de cellules ayant émis des neurites. De plus, ces modifications sont observées lorsqu'on empêche l'extension des neurites dans les cultures de cellules 1003 en agrégats.

L'immunisation de lapins avec la protéine p 47 est actuellement en cours. Ces sérums immuns devraient permettre de préciser la nature exacte de ce marqueur et de déterminer sa distribution intracellulaire. L'abondance de p 47 dans les produits de traduction d'ARN poly-A<sup>+</sup> total de cerveau de souris adultes devrait permettre le clonage du cADN correspondant.

B. *Différenciation des cellules CE de la lignée F9 induite par l'acide rétinoïque*

Un système de différenciation *in vitro* a également été établi avec la lignée F9 de cellules CE. Ces cellules ne se différencient que très rarement, aussi bien *in vivo* que *in vitro*. Cependant, comme l'a montré Strickland, un traitement à l'acide rétinoïque et au dibutyryl AMP-cyclique induit ces cellules à se différencier en endoderme pariétal qui ne synthétise pas d'alpha-fétoprotéine (AFP). En outre, B. Hogan a montré que si, au lieu de laisser les cellules F9 étalées, on les laisse former des agrégats au moment du traitement à l'acide rétinoïque, elles produisent, à la surface des agrégats, des

cellules qui ressemblent à de l'endoderme, non plus pariétal, mais viscéral et qui, elles, synthétisent de l'AFP. Les cellules F9 se comportent ainsi comme l'embryon précoce. Après traitement à l'acide rétinoïque, elles se différencient en cellules bipotentielles, semblables à l'endoderme primitif de l'embryon qui, selon les signaux reçus et l'environnement, exprime le phénotype pariétal ou viscéral.

Pour analyser le mécanisme qui oriente les cellules dans l'une ou l'autre voie, le système F9 est probablement plus simple que l'embryon. On a notamment centré cette étude sur l'expression de l'AFP dans le but d'analyser l'influence de l'environnement cellulaire (facteurs solubles, composants des matrices extracellulaires, contacts avec d'autres types cellulaires), sur la transcription du messageur AFP et sur sa traduction.

En utilisant des sondes clonées cADN spécifiques des ARN messagers de l'albumine et de l'AFP, on a pu montrer que l'ARN messageur spécifique de l'AFP n'est décelé ni dans les carcinomes embryonnaires (F9 ou PCC4-Aza), ni dans des lignées d'endoderme pariétal (ICME-6 ou Pys-2), mais est décelé dans les cellules de carcinome embryonnaire qui se différencient en agrégats en présence d'acide rétinoïque. Le rapport entre vitesse de transcription et de traduction est proche de celui observé dans les hépatomes, tumeurs qui réexpriment l'AFP. Cela est en faveur d'une régulation jouant, comme dans les hépatomes, au niveau de la transcription. En revanche, lorsque F9 se différencie, en présence d'acide rétinoïque, en monocouches (condition où l'on induirait l'endoderme primitif), les cellules ne secrètent pas d'AFP bien que leur ARN contienne des séquences capables de s'hybrider spécifiquement avec la sonde cADN AFP. Des résultats préliminaires indiquent que la taille des transcrits pourrait bien être différente de celle des messageurs AFP murs, ce qui impliquerait un contrôle post-transcriptionnel de l'expression.

On a également pu montrer que, dans les différentes lignées de térato-carcinome étudiées, le messageur pour l'albumine est toujours décelé lorsque le messageur AFP est présent et qu'une corrélation existe entre les niveaux d'expression des deux messageurs. Ces résultats sont semblables à ceux récemment rapportés par Tilgham et ses collaborateurs au cours de l'ontogenèse du foie fœtal où le niveau d'expression des messageurs AFP et albumine augmente parallèlement.

Comme les gènes de l'albumine et de l'AFP sont situés en tandem sur le même chromosome, il est tentant de postuler qu'un même événement de régulation assurant le démarrage de la transcription des gènes albumine et AFP se produit deux fois au cours du développement : d'abord pendant la formation du sac vitellin, puis pendant celle du foie fœtal.

IV. ÉTUDE GÉNÉTIQUE DE LA SOURIS :  
ANALYSE DE LA RÉGION *t*

(Hubert CONDAMINE)

Une expérience concernant la recombinaison entre deux « chromosomes *t* » a pu être menée à son terme. On sait qu'à ces chromosomes 17, très répandus parmi les populations naturelles de souris, sont associés des effets très variés : présence d'un facteur interagissant avec la mutation *T* pour empêcher le développement de la queue de l'embryon ; haute distorsion, chez les mâles hétérozygotes, dans la ségrégation des gamètes qui s'exerce au bénéfice des gamètes porteurs du chromosome *t* ; présence de facteurs létaux récessifs qui bloquent le développement embryonnaire précoce à une série de stades échelonnés entre le 3<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour de l'embryogenèse ; inhibition de la recombinaison avec le chromosome 17 des souris de laboratoire, etc. Ce dernier effet a eu pour conséquence de gêner considérablement l'étude de la structure génétique de ce qui a été appelé jusqu'à une date récente le « locus *T* » de la souris, et qu'il vaut mieux rebaptiser « haplotypes *t* » ou même « chromosomes *t* ».

Il y a deux ans, une observation de K. Artzt et L. Silver a montré que deux chromosomes *t* sont parfaitement capables de se recombiner entre eux. On a mis à profit ce résultat pour étudier la recombinaison entre deux haplotypes,  $t^{lub-1}$  et  $t^{w12}$ , choisis, le premier parce qu'il est porté par un chromosome métacentrique résultant d'une fusion robertsonnienne entre chromosomes 4 et 17 qui permet de suivre la ségrégation du centromère, le second parce qu'il est porteur d'une mutation au locus *tf*. Les descendants anoures d'un croisement entre femelles  $t^{lub-1}/t^{w12}$  et mâles *T tf* / + *tf* ont été analysés. Les facteurs létaux portés par ces deux chromosomes *t* ont ainsi pu être localisés, celui de  $t^{lub-1}$  aux deux tiers de la distance qui s'étend entre le centromère et *tf*, celui de  $t^{w12}$  très près de *tf*. Par ailleurs, le criblage d'un assez grand nombre d'anticorps, poly- ou monoclonaux, dirigés contre des produits de classe I ou II de la région H-2, a permis de repérer un anticorps monoclonal réagissant très fortement avec les cellules  $t^{lub-1}$  et pas du tout avec les cellules  $t^{w12}$ . Ce réactif a été utilisé pour étudier, en collaboration avec Marika Pla (Laboratoire du Professeur J. Colombani, Hôpital Saint-Louis), la ségrégation du locus H-2 dans cette expérience. Les résultats obtenus s'interprètent de façon plus économique si l'on admet que le locus H-2 est situé, dans ces chromosomes *t*, à gauche du locus *tf*, à proximité du facteur léthal de  $t^{lub-1}$ . Cela est en accord avec des résultats obtenus par K. Artzt et D. Bennett dans un montage expérimental différent et publiés récemment. On sait que, chez les souris de laboratoire, on place classiquement le locus H-2 à droite de *tf*, à une dizaine d'unités de recombinaison. La position différente de H-2 dans les chromosomes *t* est donc l'indice d'une struc-

ture modifiée de ces chromosomes 17 dont il reste à voir si leur organisation est bouleversée dans son ensemble ou seulement en ce qui concerne la position de ce locus particulier.

Ce résultat a, par ailleurs, été confirmé par l'analyse de deux recombinants obtenus entre un chromosome 17 « normal » (T tf H2<sup>b</sup>) et un chromosome t (en l'occurrence l'haplotype t<sup>w32</sup>). Les deux chromosomes recombinants, d'origine indépendante, possèdent une partie proximale (par rapport au centromère) dérivée de t<sup>w32</sup>, et une partie distale dérivée du chromosome « normal », à partir d'une région située à gauche de tf. L'analyse de l'ADN (collaboration avec Gabriel Gachelin, laboratoire de Ph. Kourilsky, Institut Pasteur), effectuée par digestion à l'aide de plusieurs enzymes de restriction suivie d'hybridation avec une sonde radioactive reconnaissant spécifiquement des séquences H-2 révèle que les deux recombinants ont des séquences H-2 dérivées à la fois du chromosome t<sup>w32</sup> et du chromosome normal. Pour ce qui est de leur expression, l'analyse sérologique, encore en cours, mène à penser que les séquences H-2 issues de t<sup>w32</sup> sont effectivement exprimées. La situation est moins claire pour les produits H2<sup>b</sup> qui semblent pourtant être présents au moins dans l'un des deux recombinants. On s'achemine ainsi vers la conclusion qu'on a là deux chromosomes recombinants dotés de deux locus H-2 et qu'il doit être possible d'obtenir des recombinants réciproques (section proximale dérivée du chromosome normal, section distale issue du chromosome t) dépourvus de locus H-2. Il sera intéressant de réaliser une étude détaillée de la régulation de l'expression des produits H-2 dans les chromosomes dotés de deux locus et de voir comment l'absence de tout produit H-2 (chez des homozygotes pour des recombinants du 2<sup>e</sup> type) retentit sur le développement de l'embryon et du souriceau nouveau-né (si toutefois cette condition n'est pas très tôt létale au cours de l'embryogenèse).

#### PUBLICATIONS

H. CONDAMINE et J.L. GUENET, *An attempt to determine the location of t<sup>w18</sup> lethal factor* (*Mouse News Letter*, 64, 84, 1981).

R. KEMLER, *Monoclonal antibodies against embryonic cell markers*. In : « Monoclonal antibodies and T-cell hybridomas. Perspectives and technical advances ». G.J. Hammerling, U. Hämmerling et J.F. Kearney éd., Elsevier/North-Holland Publ., Amsterdam, 1981, 127-129 (*Research Monographs in Immunology*, 3, 127-129, 1981).

M. DARMON, G. SERRERO, A. RIZZINO et G. SATO, *Isolation of myoblastic, fibro-adipogenic, and fibroblastic clonal cell lines from a common precursor and study of their requirements for growth and differentiation* (*Exp. Cell. Res.*, 132, 313-327, 1981).

M. DARMON, J. BOTTENSTEIN et G. SATO, *Neural differentiation following culture of embryonal carcinoma cells in a serum-free defined medium (Develop. Biol., 85, 463-473, 1981).*

I. DUNIA et H. JAKOB, *Assembly and removal of intercellular junctions in a mouse embryonal carcinoma cell line (5° Congrès Latino-Américain de Microscopie électronique, Bogota, 1981).*

R. KEMLER, *Analysis of mouse embryonic cell differentiation (Fortschritte der Zoologie, 26, 175-181, 1981).*

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

M.F. BOURGEADE, S. ROUSSET, D. PAULIN et C. CHANY, *Reorganization of the cytoskeleton by interferon in MSV-transformed cells (J. Interferon Res., 1, n° 2, 323-332, 1981).*

D. PAULIN et N. FOREST, *Organisation du cytosquelette dans les cellules eucaryotes (L'Année Biologique, 20, 161-191, 1981).*

P. BRÛLET et F. JACOB, *Molecular cloning of a cDNA sequence encoding a trophoderm-specific marker during mouse blastocyst formation (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 79, 2328-2332, 1982).*

J.A. LEVY, H. JAKOB, D. PAULIN, F. KELLY, J.C. CHERMANN et F. JACOB, *Productive infection of embryonal carcinoma cells with ecotropic mouse type C viruses and subsequent arrest of differentiation (Virology, 120, 157-170, 1982).*

F. JACOB, Discours « Solemne Investidura de Doctor Honoris Causa » (Université de Barcelone, mars 1982).

M. DARMON, M.H. BUC-CARON, D. PAULIN et F. JACOB, *Control by the extracellular environment of differentiation pathways in 1003 embryonal carcinoma cells : study at the level of specific intermediate filaments (E.M.B.O. Journal, 1, 901-906, 1982).*

F. HYAFIL et F. JACOB, *Cell-cell interactions in early embryogenesis (Biol. Cell., 45, 404, 1982).*

F. JACOB, *Cancer as a failure of normal differentiation. In : « Research frontiers in aging and cancer » (National Cancer Inst. Monograph., n° 60, 217-219, 1982).*

F. JACOB, Déposition devant le « Select Committee on Aging ». In : « Research frontiers in aging and cancer » (National Cancer Inst. Monograph., n° 60, 285-286, 1982).

F. JACOB, *Génie génétique : une imprévisible retombée de la recherche fondamentale (Recherche et Santé, 6, 8-11, 1982).*

D. PAULIN, H. JAKOB, F. JACOB, K. WEBER et M. OSBORN, *In vitro differentiation of mouse teratocarcinoma cells monitored by intermediate filament expression* (*Differentiation*, 22, 90-99, 1982).

P. COCHARD, N. LE DOUARIN, D. PAULIN et F. JACOB, *Early expression of neurofilaments in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo* (*Biol. Cell.*, 45 (2), sp. issue, 206, 1982).

T. MURAMATSU, H. MURAMATSU, G. GACHELIN et F. JACOB, *High molecular weight carbohydrates on embryonal carcinoma cells*. In : « Teratocarcinoma and embryonic cell interactions ». T. Muramatsu, G. Gachelin, A.A. Moscona et Y. Ikawa éd., Japan Scientific Societies Press (*Academic Press*, 143-156, 1982).

O. BENSUADE et M. MORANGE, *A 93-95 Kdalton molecular weight heat shock protein is a major component of mouse embryonal carcinoma cells* (*Biol. Cell.*, 45 (2), sp. issue, 82, 1982).

M. DARMON, W. STALLCUP, Q. PITTMAN et G. SATO, *Control of differentiation pathways by the extracellular environment in an embryonal carcinoma cell line*. *Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Growth of cells in hormonally defined media* (G. Sato et R. Ross éd., 9, 997-1006, 1982).

D. BARNES, M. DARMON et J. ORLY, *Serum spreading factor : effects on RF1 rat ovary cells and 1003 mouse embryonal carcinoma cells in serum-free media*. *Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Growth of cells in hormonally defined media* (G. Sato et R. Ross éd., 9, 1982).

M. DARMON, W. STALLCUP et Q. PITTMAN, *Induction of neural differentiation by serum-deprivation in cultures of the embryonal carcinoma cell line 1003* (*Exp. Cell. Res.*, 138, 73-78, 1982).

S. ROBINE-LEON, M.D. APPAY, G. CHEVALIER, J. PERREAU, A. ZWEIBAUM et D. PAULIN, *Ultrastructural and biochemical characterization of a cloned population of mouse keratinocytes in culture* (*Exp. Cell. Res.*, 139, 27-37, 1982).

M.H. BUC, M. DARMON, H. JAKOB et D. PAULIN, *Control by the extracellular environment of neuronal and glial differentiation in mouse embryonal carcinoma cells : study at the level of specific intermediate filaments* (*Biol. Cell.*, 45 (2), sp. issue, 206, 1982).

K. DELLAGI, J.C. BROUET, J. PERREAU et D. PAULIN, *Human monoclonal IgM with autoantibody activity against intermediate filaments* (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 79, 446-450, 1982).

A. PROCHIANZ, A. DELACOURTE, M.C. DAUGUET et D. PAULIN, *Intermediate filament proteins in mouse brain cells cultured in the presence or in the absence of fetal calf serum* (*Exp. Cell. Res.*, 139, 401-410, 1982).

K. DELLAGI, J.C. BROUET, W. VAINCHENKER et D. PAULIN, *Intermediate filaments of human blood cells and their precursors* (*Biol. Cell.*, 45 (3), 437, 1982).

E. GEORGES, M. VASSEUR et D. BLANGY, *Polyoma virus mutants as probes of variety among mouse embryonal carcinoma cell lines* (*Differentiation*, 22, 62-65, 1982).

M. VASSEUR, M. KATINKA, P. HERBOMEL, M. YANIV et D. BLANGY, *Physical and biological features of polyoma virus mutants able to infect embryonal carcinoma cell lines* (*J. Virol.*, 43, 800-808, 1982).

F. KELLY et H. CONDAMINE, *Tumor viruses and early mouse embryos* (*Biochim. Biophys. Acta*, 651, 105-141, 1982).

M. DARMON, A. BARRET, J. PUYMIRAT et A. FAIVRE, *Cholinergic neurons and embryonal mesenchymal cells arise from the same population of precursor cells in cultures of embryonal carcinoma cells triggered to differentiate by serum-deprivation* (*Biol. Cell.*, 45 (1), sp. issue, 10, 1982).

A. PROCHIAANTZ, M.C. DAGUET, A. DELACOURTE, J. GLOWINSKI et D. PAULIN, *Serum free medium utilization in studies of neuronal interactions during development* (*Biol. Cell.*, 45 (1), sp. issue, 33, 1982).

C. ZILLER, E. DUPIN, P. BRAZEAU, D. PAULIN et N. LE DOUARIN, *Neuronal differentiation of quail neural crest cells cultured in a serum-free medium* (*Biol. Cell.*, 45 (1), sp. issue, 41, 1982).

M.C. DARMON, A. DELACOURTE, J. PERREAU, M.H. BUC, M.Y. DARMON et D. PAULIN, *Expression of neurofilament proteins during differentiation of mouse teratocarcinoma cells : clonage of mRNAs coding for neurofilament proteins* (*Biol. Cell.*, 45 (2), sp. issue, 206, 1982).

N. FOREST, M.L. BOY-LEFEVRE, J.A. GRIMAUD, H. JAKOB et D. PAULIN, *Collagen synthesis in mouse embryonal carcinoma cells : effect of retinoic acid* (*Biol. Cell.*, 45 (2), sp. issue, 150, 1982).

J.P. THIERY, A. DELOUVEE et D. PAULIN, *Early differentiation of avian neural crest cells* (*Biol. Cell.*, 45 (2), sp. issue, 203, 1982).

B. MARO, M.E. SAURON, D. PAULIN et M. BORNENS, *Taxol induced redistribution of vimentin filaments in HeLa cells* (*Biol. Cell.*, 45 (2), sp. issue, 204, 1982).

D. SANDOZ, P. GOUNON, E. KARSANTI, E. BOISVIEUX-ULRICH, M.C. LAINE et D. PAULIN, *Organization of cytoskeleton in the ciliated cells from quail oviduct* (*Biol. Cell.*, 45 (2), sp. issue, 207, 1982).