

### Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

L'année dernière, le cours avait été consacré à l'étude de la différenciation en relation avec la position des cellules chez la *Drosophile*. Cette année, on a étudié le même sujet chez la Souris. Chez la *Drosophile*, on connaît des mutants qui modifient profondément la structure du corps — mutations produisant des organismes avec deux têtes et pas de région postérieure ou deux régions postérieures et pas de tête — ou qui modifient le destin d'un segment — mutants homéotiques qui transforment par exemple une patte en antenne. De nombreux laboratoires ont réussi à préciser les gènes en cause dans ces mutations et à les cloner. Ce matériel devrait permettre de progresser rapidement dans l'analyse du développement embryonnaire de la *Drosophile*. D'autant que des expériences récentes ont montré la possibilité, à l'aide du « transposon P », de transformer des embryons précoces par des fragments d'ADN qui viennent s'insérer dans le génome des cellules germinales et permettent ainsi la production de lignées transformées stables. Les gènes déterminant les trois enzymes Dopa-décarboxylase, xanthine-déshydrogénase et alcool-déshydrogénase ont ainsi été insérés dans le génome, chacun à une série de sites différents. Dans les trois cas, les gènes sont exprimés et leur régulation à peu près normale, dans le temps du développement comme dans l'espace des tissus. Dans les trois cas, le fragment d'ADN inséré dans le transposon est relativement petit : 5 à 8 kilobases. Dans les trois cas, un seul gène est inséré à la fois. Il semble donc relativement aisé d'analyser les éléments de régulation en supprimant des segments plus ou moins étendus de l'ADN, soit en amont, soit en aval du gène de structure.

En revanche, les tentatives semblables faites sur la Souris se sont révélées beaucoup plus décevantes. De nombreux essais ont permis d'insérer des gènes globines de Lapin dans le génome de Souris. Mais d'une part, on trouve le plus souvent un grand nombre de gènes insérés en tandem et, d'autre part, ces gènes ne sont pas exprimés d'une manière qui rappelle l'expression du gène homologue « normal ». Des résultats un peu plus encourageants ont été obtenus en insérant dans la Souris le gène de la transférine

de Poulet. Ce gène, en effet, s'exprime dans une série de tissus sans toutefois que sa régulation corresponde à celle observée normalement dans le Poulet ou la Souris.

Ces résultats ont donc conduit à disséquer des éléments génétiques différents pour les réassortir selon différentes combinaisons et, après réinjection et insertion, préciser l'expression des différentes structures ainsi formées. Les résultats les plus intéressants ont été obtenus par Palmiter et par Brinster qui ont couplé différents gènes de structure à la région régulatrice et au promoteur de la métallothionine I de Souris. La métallothionine est un polypeptide riche en cystéine qui fixe les métaux lourds et auquel on attribue un rôle dans la régulation du Zn et la résistance à la toxicité des métaux lourds. Ce polypeptide est présent dans la plupart des tissus de la Souris et se comporte comme une protéine dite « de ménage ». La transcription de ce gène est inductible par les métaux lourds et les glucocorticoïdes. Différents gènes de structure ont ainsi été couplés à la région régulatrice de ce gène, notamment la thymidine-kinase du virus de l'herpès. Les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus avec l'hormone de croissance, soit de Rat, soit humaine. L'insertion de ces gènes a entraîné la production de Souris géantes dont la photographie a fait la première page des revues *Nature* et *Science* successivement. Chez un nombre appréciable d'animaux injectés avec de telles structures et bien qu'on observe un grand nombre de copies insérées en tandem, non seulement ce gène est exprimé mais il est inductible par les métaux lourds sinon par les glucocorticoïdes. Un fait reste troublant. Dans la plupart des cas où le gène est exprimé, on constate qu'au fil des générations successives, le niveau d'expression du gène inséré subit des variations considérables sans qu'on puisse trouver des remaniements de structure chromosomique susceptibles de les expliquer.

On peut se demander pourquoi les insertions de gène avec expression et régulation à peu près normales se font si bien chez la *Drosophile* mais non chez la Souris. Il y a trois possibilités :

1. Ou bien il y a une différence importante dans l'ADN injecté. Cela signifierait, par exemple, que le vecteur P utilisé chez la *Drosophile* possède des vertus particulières que ne possèdent pas les vecteurs utilisés jusqu'ici chez la Souris. Il se pourrait, par exemple, que le facteur P de la *Drosophile* « isole » en quelque sorte le gène cloné de manière qu'il reste sous la dépendance des facteurs qui gouvernent normalement sa régulation.

Il se peut que, comme vecteurs, des éléments mobiles tels que les transposons présentent des propriétés particulièrement intéressantes pour les expériences de transfert de gènes. On peut concevoir que de tels éléments ont été sélectionnés grâce à leur capacité de fonctionner dans des sites les plus variés du génome. En dehors des rétrovirus, on ne connaît pas de

transposons bien caractérisés chez la Souris. On a discuté en détail certaines situations de locus très instables — certains allèles du locus perle (pearl) ou œil rose (pink eye) dont les propriétés rappellent fortement les insertions du facteur P dans certains gènes de la *Drosophile*.

2. Les différences entre *Drosophile* et Souris peuvent être dues à des différences dans la chromatine où viennent s'insérer les fragments d'ADN. Un gène inséré pourrait, par exemple, trouver plus facilement chez la *Drosophile* que chez la Souris un site où il serait transcrit.

Il existe quelques arguments en faveur d'une telle hypothèse. D'abord des expériences effectuées sur la Souris par Jaenisch — et qu'on aura l'occasion de décrire en détail — ont montré que le génome des rétrovirus inséré dans le génome de la lignée germinale est souvent incapable de s'exprimer. D'autre part, le génome de la *Drosophile* contient 20 fois moins d'ADN que celui des Mammifères. Une Mouche semble plus simple qu'une Souris, mais il paraît peu probable qu'elle contienne vingt fois moins de gènes. La différence du contenu en ADN génomique pourrait alors être due à la rareté chez la *Drosophile* de sites inertes où l'intégration d'un gène étranger ne peut autoriser son expression. De la sorte, la majorité des intégrations effectives seraient, chez la *Drosophile*, des intégrations réussies, repérées d'autant plus facilement dans les expériences réalisées jusqu'à maintenant que l'expression du gène injecté était utilisée comme marqueur sélectif. Dans un petit nombre de cas, on a observé l'intégration non pas de un, mais de deux gènes. Et il semble bien que, dans ces cas, les deux gènes soient capables de fonctionner.

3. Enfin, on ne peut exclure une différence de nature dans les mécanismes même réglant l'expression des gènes chez l'un ou l'autre organisme. Il existe un argument en faveur d'une telle hypothèse. L'ADN de Mammifère contient des quantités importantes de cytosine méthylée et le degré de méthylation semble avoir quelque importance pour la régulation de l'expression des gènes. Au contraire, l'ADN de *Drosophile*, ne contient pas, ou très peu, de bases méthylées. Quoique la signification d'une telle différence ne soit pas encore très claire, il n'est pas exclu qu'elle reflète une différence dans les mécanismes gouvernant l'accessibilité de certaines régions du génome.

Après avoir résumé les diverses étapes du développement menant à la formation du blastocyste, on a discuté les manipulations qu'il est possible d'effectuer sur l'embryon de Souris avant son implantation. Le reste du cours a alors été consacré à certains aspects de l'expression des gènes pendant le début du développement. On sait que c'est le génome maternel qui, ayant assuré la formation de l'œuf, gouverne la mise en route du zygote après fécondation. C'est seulement plus tard qu'entre en action le génome

de l'embryon. Chez de nombreux invertébrés ou vertébrés inférieurs (Batraciens) le passage se fait tardivement, les étapes précoces du développement restant régi par des ARN messagers maternels stockés dans l'œuf, parfois jusqu'à la gastrulation. Chez les Mammifères, au contraire, ce passage se fait à un stade très précoce.

On a alors décrit en détail les arguments expérimentaux permettant de préciser le moment de l'activation du génome de l'embryon de Souris. Ces arguments sont de plusieurs types.

*Arguments génétiques* : expressions précoces d'allèles d'origine paternelle chez le zygote.

*Arguments biochimiques* :

— synthèses, par le zygote de différents types d'ARN et notamment d'ARN-poly A ;

— synthèse de protéines spécifiques et, en particulier, synthèses qui peuvent être bloquées par des inhibiteurs de synthèse d'ARN-poly A ( $\alpha$ -amanitine).

Le groupe de Johnson, à Cambridge, a montré qu'à la fin du stade à 1 cellule apparaît un groupe de protéines dont la synthèse se poursuit en présence d' $\alpha$ -amanitine, donc de protéines déterminées par le génome maternel. Au début du stade à 2-cellules sont synthétisées deux protéines de poids moléculaire voisin de 70 kilodaltons, protéines qui n'apparaissent pas en présence d' $\alpha$ -amanitine. Ce sont donc les deux premières protéines dont la synthèse est régie par le génome de l'embryon. A la fin du stade 2-cellules, c'est toute une série de protéines nouvelles déterminées par le génome embryonnaire qui apparaissent. A l'Institut Pasteur, O. Bensaude et M. Morange ont démontré que les deux premières protéines formées au début du stade 2-cellules, sont en réalité deux protéines dites de « choc thermique », de 68 à 70 kilodaltons. Il se pourrait que la présence de ces deux protéines, dont la fonction est encore inconnue, soit nécessaire à l'expression du génome embryonnaire.

F. J.

#### SÉMINAIRES

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

M. Olivier BENSAUDE, Chargé de recherches au C.N.R.S., a décrit l'expression des protéines de choc thermique au cours de l'embryogenèse précoce de la Souris.

M. Christopher HENDERSON, Assistant à l'Institut Pasteur, a présenté ses recherches sur les facteurs de croissance des neurones spinaux chez le Poulet.

M. José-Maria SALA-TREPAT, Maître de recherches au C.N.R.S., a donné une conférence intitulée : Régulation de l'expression des gènes au cours du développement et de la cancérogenèse : le locus albumine- $\alpha$ -foetoprotéine chez les Mammifères.

M. François ROUGEON, Maître de recherches au C.N.R.S., Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, a discuté la structure et l'expression des gènes codant pour la rénine chez la Souris.

M<sup>me</sup> Margaret BUCKINGHAM, Maître de recherches au C.N.R.S., a fait un exposé sur la myogenèse chez la Souris et les familles multigéniques des actines et les myosines.

MM. Marc FELLOUS, Professeur à l'Université de Paris VII, Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, et Jean WEISSENBACH, Chargé de recherches au C.N.R.S., ont proposé une mise au point sur le chromosome Y intitulée : Hommes XX, femmes XY, leurs analogues murins : analyse génétique formelle et moléculaire.

M<sup>me</sup> Jeanine BEISSON, Directeur de recherches au C.N.R.S., a traité le sujet : Différenciation et organisation cellulaires : biogenèse des structures chez la Paramécie.

M. Gérard ROIZES, Maître de recherches au C.N.R.S., a décrit les changements affectant les séquences d'ADN répétées des génomes eucaryotes au cours de l'évolution, leurs mécanismes et leurs conséquences.

M. Michel BORNENS, Maître de recherches au C.N.R.S., a donné une conférence sur la nucléation des microtubules *in vivo* et ses variations en fonction du cycle et de la différenciation cellulaire.

#### 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 dévelop-

pement 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. PROPRIÉTÉS DES CELLULES DE CARCINOME EMBRYONNAIRE (CE)

(Marie-Hélène BUC, François JACOB, Hedwig JAKOB, Laurence MAILLET, Jean-François NICOLAS et Michel SIMONNEAU)

Ces cellules, qui représentent 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. Expression de gènes introduits dans les cellules CE

L'une des voies donnant accès aux mécanismes de régulation en jeu dans le développement de l'embryon et la différenciation cellulaire consiste à introduire dans les cellules CE des gènes variés et à en analyser l'expression dans des conditions diverses.

1) *Le système de transformation.* Pour étudier la régulation qui agit sur le génome dans la différenciation, Jean-François Nicolas a préparé à Stanford, dans le laboratoire de P. Berg, des vecteurs contenant certains éléments du virus SV40, des gènes permettant une sélection et des promoteurs d'origines diverses auxquels peuvent être raccordés les gènes à étudier. Ces vecteurs permettent d'insérer les gènes les plus divers dans les cellules multipotentielles avec des fréquences de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$ , l'ADN introduit se trouve intégré de manière stable. La sélection est réalisée en utilisant soit la résistance à la néomycine (néo) à laquelle la plupart des cellules sont sensibles, soit, dans les cellules dépourvues d'hypoxanthine-phosphoribosyl-transférase (HPRT), l'enzyme d'*Escherichia coli* (GPT) qui présente des propriétés particulières.

Les premières études avaient montré qu'après quelques semaines de culture en milieu non sélectif se produit une inactivation des gènes introduits. L'inactivation touche en général plusieurs gènes à la fois. Il suffit de maintenir une pression sélective (par exemple néo) pour conserver l'expression d'un autre gène introduit par cotransformation. Les cellules inactivées peuvent se réactiver spontanément à faible fréquence ( $10^{-6}$  -  $10^{-7}$ ). Une fois

encore la réactivation touche plusieurs gènes à la fois mais l'analyse de l'ADN des cellules inactivées ne révèle pas de changement dans l'organisation des gènes. Enfin, à partir de cellules transformées (par le plasmide pSV3gpt) qui n'expriment le gène *gpt* que faiblement, il est possible de sélectionner des variants qui produisent de 20 à 50 fois plus d'ARN que les cellules parentales. Ce phénomène, qui n'est pas lié à une amplification génique de *gpt*, touche aussi la région précoce de SV40, adjacente au gène *gpt*.

C'est à partir de ces données qu'ont été poursuivies les recherches au cours de l'année écoulée.

2) *Problème de l'expression de la région précoce de SV40 dans les cellules CE.* Pour savoir si le fonctionnement du promoteur de la région précoce de SV40 présentait des anomalies dans les cellules CE, on a mesuré l'activité transitoire du gène Xgpt mis sous contrôle soit du promoteur complet de la région précoce de SV40, y compris les deux augmentateurs de transcription (plasmide pSV2A *gpt*), soit d'un promoteur séparé par délétion de ces augmentateurs (plasmide pSV232A *gpt*). On ne décèle d'activité XGPT qu'avec pSV2A *gpt*. Cependant, si on réintroduit ces augmentateurs en 3'OH du gène XGPT dans pSV232 A *gpt*, on rétablit l'activité du gène.

Quand le promoteur minimal de SV40 est échangé pour le promoteur de la  $\beta$ -globine de Souris dans les plasmides pSV232 A *gpt* et pSV232 A *gpt* LR, seul ce dernier exprime XGPT. Ainsi, les principales caractéristiques de l'augmentateur de SV40 — action à distance en *cis* et action sur un promoteur hétérologue — sont observées dans les cellules CE. Une comparaison de l'expression des vecteur pSV232 *gpt* LR, pSV2 *gpt* et pSV $\beta$  *gpt* LR, dans les cellules PCC3 et trophoblastiques a permis de montrer que leurs activités relatives étaient les mêmes. Si une différence existe dans le fonctionnement du promoteur de SV40, il ne peut donc s'agir que d'une différence quantitative due à l'augmentateur et indépendante du promoteur minimum sur lequel il agit. D'autres constructions sont en cours pour mettre à l'épreuve les deux autres hypothèses pouvant rendre compte du changement de rapport T/t au cours de la différenciation : (a) changement du 5'OH des messagers produits, (b) effet direct au niveau du signal d'épissage.

3) *Inactivation des gènes en milieu sélectif.* On a mis au point les conditions permettant de faire la sélection de cellules n'exprimant plus XGPT de *E. coli*. Les cellules PCC3 transformées par *gpt* étant HGPRT<sup>-</sup>, il est possible de sélectionner en 6-thioguanine. Cependant, deux complications sont apparues : les cellules CE sont beaucoup plus sensibles à la 6-thioguanine que les cellules différenciées, la fenêtre de sélection étant donc beau-

coup plus étroite (1 à 4 µg/ml) ; ces cellules coopèrent entre elles très efficacement. Ainsi dans des expériences de reconstitution où on mélange des cellules XGPT<sup>+</sup> et XGPT<sup>-</sup>, la réponse n'est linéaire qu'à basse concentration de cellules (400/cm<sup>2</sup>). En utilisant ces conditions, on peut mettre en évidence des cellules CE XGPT<sup>-</sup> même dans les cultures maintenues en milieu mycophénolique-guanine. Un test Luria-Delbrück est en cours pour estimer plus précisément le taux de réversion vers XGPT<sup>-</sup> dans les transformants CE et leurs dérivés différenciés.

4) *L'inactivation est-elle due à un effet cis ou trans ?* La majorité des clones CE inactivés apparaissent spontanément dans les cultures maintenues sans pression de sélection, perdent l'activité XGPT et 3'-O-phosphotransférase (APH (3')II, néo). Ce fait peut s'expliquer soit par un effet trans, soit par un mécanisme agissant sur le long fragment d'ADN. Cependant, lorsqu'on mesure l'activité APH II' sur les clones CE sélectionnés en 6-thioguanine, on trouve une activité APH (3')II importante. Cela conduit à penser que l'inactivation est probablement due à un mécanisme du type cis qui augmente très fortement la probabilité d'inactivation du second gène.

5) *La suractivation est-elle due à un effet cis ?* Les variants du clone transformé pour pSVtk néoβ et pSV3 (PCC3 SV3-5) qui surproduisent GPT et les antigènes T et t au niveau mRNA et protéine ont maintenant été analysés pour leur expression du gène néo. Aucune augmentation de la quantité d'APH II' n'a pu être décelée. Ainsi, seules les copies de Xgpt et de la région précoce de SV40 voient leur expression modifiée. Cela n'est donc probablement pas dû à un effet trans agissant sur les promoteurs de la région précoce de SV40 commun à ces gènes.

6) *Expression des copies intégrées à l'état silencieux dans les cellules CE.* Le clone pSV3-6 sélectionné pour pSVtk néoβ a intégré plusieurs copies de pSV3. Aucune de ces copies ne s'exprime cependant ni dans les cellules CE ni dans les dérivés différenciés obtenus après traitement à l'acide rétinolique. Cependant, lorsque la sélection pour XGPT est appliquée sur les cellules différenciées, de rares clones sont sélectionnés qui expriment l'enzyme bactérien. Une analyse des copies intégrées, en utilisant la technique de Southern, a permis de déceler des remaniements interprétables presque toujours comme des délétions. L'étude moléculaire de ces remaniements et de la structure des mRNA produits devrait permettre de comprendre ce nouveau type de blocage de l'expression d'un gène.

7) *Réactivation par l'azacytidine de gènes introduits dans des cellules CE et inactivés.* Comme on l'a vu, les cellules transformées maintenues en milieu sélectif pour la résistance à la néomycine, expriment les deux gènes. Lorsque

la culture est effectuée en l'absence de néomycine, l'expression des deux gènes est perdue bien que les ADN correspondant à ces gènes soient toujours présents dans le génome sans modification apparente. On a cherché à réactiver ces gènes avec l'azacytidine. On a ainsi constaté que :

a) pour tous les mutants analysés jusqu'ici il a été possible d'obtenir la réexpression du ou des gènes « silencieux » ;

b) les doses de 5-azacytidine les plus efficaces varient d'un mutant à l'autre. Elles se situent en général entre 2 et 5  $\mu\text{M}$  pour une durée de traitement de 24 h suivie d'un délai d'expression de 48 h ;

c) toutes les sélections après traitement à l'azacytidine ont été effectuées en milieu néomycine. Cependant, dans un grand nombre de cas il y avait en même temps que l'expression de la résistance à la néomycine, co-réactivation de l'expression de la *gpt* bactérienne. Selon les souches, il y a co-réactivation dans 100 % des clones ou au contraire de 50 à 80 % de clones « co-réactivés » seulement ;

d) les fréquences de réactivation obtenues pour les différents mutants sont les mêmes, de l'ordre de  $1/10^{-4}$  cellules, qu'il y ait une ou plusieurs copies du gène intégrées. Cela semble indiquer que l'action de l'azacytidine ne se situe pas directement au niveau du gène lui-même mais peut-être dans une autre région.

Les études sur la structure de l'ADN et sur l'état de leur méthylation dans les gènes *néo<sup>R</sup>* et *gpt* sont en cours.

Une autre catégorie de mutants, isolés après croissance dans un milieu sélectif contenant de l'acide mycophénolique et de la guanine, n'expriment pas les gènes *néo<sup>R</sup>* et *gpt* bactériens mais se multiplient grâce à une HPRTase cellulaire. Les cellules PCC3 utilisées pour recevoir l'ADN exogène sont HPRT négatives et il s'agit de réversions cellulaires. Les ADN correspondant aux deux gènes non exprimés sont toujours intégrés dans le génome. Ces mutants, traités par la 5-azacytidine et soumis à une sélection en présence de néomycine, donnent une fréquence faible (environ  $10^{-5}$ ) de clones *néo<sup>R</sup>*. Des analyses préliminaires semblent montrer qu'ici, dans la plupart des clones, la *gpt* bactérienne n'est pas réexprimée, mais il y aurait de rares clones où l'HPRT cellulaire et la *gpt* bactérienne sont exprimés.

L'étude des réarrangements éventuels de l'ADN dans ces mutants ainsi que les niveaux d'expression des différents enzymes, sont en cours.

*B. Réactivation du gène HPRT porté par le chromosome X inactif dans des lignées de cellules femelles pseudo-diploïdes*

Le traitement par la 5-azacytidine de cellules femelles (CE ou fibroblastes) déficientes en activité HPRTase (incapables de se multiplier dans le milieu sélectif HAT) a pour effet de faire apparaître des cellules productrices d'HPRT lorsqu'on applique une sélection HAT. La fréquence d'apparition de ces cellules HPRT<sup>+</sup> est d'environ 1/10<sup>3</sup> cellules.

Aucune expression de cet enzyme n'a été obtenue en traitant de la même manière des cellules soit XY, soit XO. Il semble donc que l'expression est due à la réactivation du gène *hprt*<sup>+</sup> qui se trouve sur le chromosome X inactif. En accord avec d'autres auteurs, on a trouvé que le niveau quantitatif d'expression de ces « réactifs » était souvent inférieur à celui du type sauvage.

En collaboration avec P. Avner qui dispose de sondes de cDNA pour une partie du gène *hprt* (venant du laboratoire de Caskey) on cherche à analyser des modifications de l'état de méthylation des ADN extraits des différentes souches « réactivées ». L'analyse de ces différents ADN est en cours.

*C. Interactions cellulaires et différenciation en endoderme*

Des fragments monovalents d'anticorps anticarcinome embryonnaire ajoutés à une culture d'œufs de souris empêchent la « compaction » de l'embryon et la formation ultérieure du blastocyste. Ces anticorps ont été ajoutés à des cellules de tératocarcinome, afin de détruire les contacts entre cellules et d'observer les conséquences de ce traitement sur le spectre de différenciation obtenu. Lorsque les cellules de tératocarcinome PSMB sont cultivées en suspension en absence d'anticorps, elles forment des structures, les corps embryonnaires, constituées d'une masse centrale indifférenciée et d'une couche périphérique différenciée en endoderme pariétal et viscéral. Cellules internes et externes sont séparées par une matrice extracellulaire. Après traitement par les anticorps, les corps embryonnaires sont totalement désorganisés ; en particulier, les constituants de la matrice extracellulaire sont maintenant répartis dans tout l'agrégat. Les cellules indifférenciées ont disparu, tandis qu'une population différenciée occupe tout le volume de l'agrégat. La présence de cytokératine dans les cellules, ainsi que la synthèse de laminine et de collagène de type IV permettent de penser qu'une différenciation en endoderme pariétal a été spécifiquement induite. Au contraire, la sécrétion d'alpha-fœtoprotéine, caractéristique de l'endoderme viscéral, est fortement diminuée. Il semble donc que des interactions cellulaires spécifiques, peut-

être avec les cellules indifférenciées soient nécessaires à la différenciation en endoderme viscéral, tandis que la différenciation en endoderme pariétal serait induite lorsque des contacts inhibiteurs sont levés.

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

(Olivier BENSAUDE, Philippe BRÛLET, Philippe DUPREY, Mourad KAGHAD, Valérie MEZGER, Michel MORANGE, Nadine PEYRIERAS et Marc VASSEUR)

L'étude de l'embryon au tout début du développement s'est concentrée d'une part sur l'analyse des protéines dites de choc thermique, d'autre part sur les marqueurs caractérisant chacun des tissus du blastocyste ainsi que sur l'uvomoruline impliquée dans les interactions cellulaires précoces.

### A. Protéines de choc thermique

Dans la plupart des cellules, de la bactérie à l'homme, des traitements variés allant du choc thermique à l'infection virale en passant par l'exposition à des produits chimiques (éthanol, arsenite de sodium, métaux lourds, etc.) provoquent une forte stimulation de la synthèse d'une demi-douzaine de protéines très conservées, appelées protéines de choc thermique (PCT ou HSP). Dans le cas de fibroblastes de souris, on distingue couramment des protéines à 105, 89, 70, 68 et 59 Kdaltons.

En 1982, on avait montré d'une part que trois de ces protéines sont des constituants majeurs des cellules de carcinome embryonnaire murin en absence de toute agression, d'autre part que les traitements évoqués ci-dessus ont peu, voire aucun effet (pour certaines lignées) sur les profils de synthèses protéiques. Au cours de l'année écoulée, on a étudié la synthèse des protéines de choc thermique dans l'embryon de souris.

1. *Synthèse spontanée et inductibilité des protéines de choc thermique dans l'embryon du stade 8 cellules au blastocyste.* La ressemblance entre les cellules de carcinome embryonnaire et celle de l'embryon précoce est confirmée pour les protéines de choc thermique. A ces stades, les PCT de 89, de 70 et de 59 Kdaltons sont synthétisées spontanément en fortes quantités, en particulier au stade 8 cellules, la synthèse des PCT de 89 et de 70 Kd domine celle de toutes les autres protéines cellulaires dont celle de l'actine. D'autre part, le choc thermique est sans effet sur le profil des synthèses protéiques au stade 8 comme dans le cas des lignées de carcinome embryonnaire PCC7-1009, PCC4. Au stade blastocyste une PCT, celle de

68 Kd devient inductible alors que celle de 105 Kd ne l'est pas, comme chez les lignées de carcinome embryonnaire F9 ou PCC3. Des observations semblables avaient déjà été rapportées au cours de l'embryogenèse de la *Drosophile* et de l'Oursin. Mais l'intérêt de ces observations chez la Souris réside dans l'existence des lignées de carcinome embryonnaire, qui devraient permettre d'analyser le mécanisme de contrôle de l'expression des PCT.

2. *Premières protéines dont la synthèse dépend de l'activation des gènes du zygote au stade 2 cellules.* Les synthèses protéiques, dans un ovocyte fécondé, restent sous le contrôle des ARN messagers d'origine maternelle stockés pendant l'ovogenèse. Chez la Souris, cette situation dure plus de 24 h après la fécondation, temps pendant lequel l'œuf s'est clivé en deux cellules. C'est au stade 2 cellules qu'on a pu démontrer l'activation des gènes du zygote. Contrairement au premier clivage, le passage au stade 4 cellules est bloqué par les inhibiteurs de la transcription. G. Flach et ses collègues de Cambridge (Grande-Bretagne) ont montré qu'au début du stade 2 cellules, la synthèse d'un nouveau groupe de protéines de masse 67 Kd devient décelable, mais seulement en absence d'inhibiteurs de la transcription. On a identifié ces protéines aux PCT de 70 et 68 Kd par comigration en gel à deux dimensions et par comparaison de leurs profils de protéolyse ménagée (protocole de Cleveland). Il existe donc une analogie entre la récupération d'une cellule agressée et l'activation de l'œuf. En fait nombre des conditions qui activent la parthénogénèse induisent la synthèse des PCT dans les cellules différenciées.

#### B. *Génétique moléculaire de l'endo A, kératine marqueur du trophectoderme*

Au cours des années précédentes, il avait été montré que les cellules du trophectoderme, mais non celles de la masse interne, contiennent un réseau de filaments intermédiaires constitués notamment par l'Endo A, protéine du groupe des kératines. Grâce à une série d'anticorps monoclonaux, le mARN spécifiant la structure de cette protéine a été purifié, recopié partiellement en cADN et inséré dans un plasmide (sonde Rec XVI d'environ 200 paires de bases correspondant à l'extrémité 3' du mARN).

L'hybridation d'ADN de souris 129, coupé par l'enzyme RI, avec la sonde Rec XVI donne deux bandes de 2,3 et 2,5 kb. Le cDNA Rec XVI étant dépourvu de site RI, on doit donc s'attendre à trouver au moins deux gènes. En outre, l'hybridation de Rec XVI à ces deux bandes n'est pas identique et si l'homologie est de 100 % avec la bande de 2,5 Kb, elle n'est que de 80 - 90 % avec la bande de 2,3 Kb.

L'analyse d'une banque génomique avec la sonde Rec XVI a permis d'isoler 7 clones qui se répartissent en deux types :  $\lambda$ 34 et  $\lambda$ 24. La longueur de

l'insertion totale dans  $\lambda 34$  est de 15 Kb, celle de  $\lambda 24$  est de 20 Kb. Si l'on coupe le mARN de ces deux clones par RI, Rec XVI hybride dans le clone  $\lambda 34$  avec une bande de 2,3 Kb, et dans le clone  $\lambda 24$  avec une bande de 2,5 Kb. On retrouve donc avec ces deux clones les deux bandes initialement observées dans l'ADN génomique. Des hybridations croisées réalisées entre les ADN de ces deux clones montrent que dans le  $\lambda 34$ , seul le fragment de 2,3 Kb est reconnu par quatre des fragments du  $\lambda 24$  qui totalisent une longueur de 10 Kb environ. Ces hybridations croisées montrent également que ces deux clones sont composés de séquences non pas identiques, mais plutôt hautement homologues (environ 80 à 90 % d'homologie).

Les différents fragments RI de ces deux clones génomiques ont été sous-clonés et leur analyse a permis de confirmer que les séquences contenues dans le fragment de 2,3 Kb issu du  $\lambda 34$  s'hybridaient avec une longueur totale de 10 Kb du DNA de  $\lambda 24$ . On se trouve donc en présence de deux gènes de taille très différente, d'où la possibilité que le plus court soit un pseudo-gène. Ces deux gènes se trouvent associés à des séquences moyennement répétitives (environ  $\times 1000$ ), longues de 2 Kb.

Les deux clones génomiques, 34 et 24 repèrent dans les cellules de trophoblastome un ADN de 18S identique à celui reconnu par Rec XVI. De plus, dans le clone  $\lambda 24$ , la séquence répétitive localisée en 5' du gène d'Endo A s'hybride avec un ARN long de 900 bases, présent dans les cellules F9 à un taux environ 100 fois supérieur à celui des cellules de trophoblastome. Cet ARN est poly A<sup>+</sup>. Dans les cellules PCC4, qui synthétisent faiblement du mARN 18S d'Endo A, la quantité d'ARN 9S décelée est environ 10 fois plus basse que dans F9. Sur un court fragment d'ADN, on a donc un effet de balance entre la régulation de la transcription de deux régions adjacentes.

L'étude de la méthylation des gènes d'Endo A dans différentes lignées de cellules CE et de trophoblastome est en cours.

### *C. Mise en évidence d'une séquence répétée et dispersée dans le génome qui s'exprime différemment dans les cellules de l'embryon précoce*

En utilisant l'ARN (poly A) de cellules CE, on avait pu préparer une souche de cADN (300 pb) qui s'hybridait avec le mARN des cellules CE mais non avec celui des cellules de trophoblastome. Cette sonde permet de déceler un ARN de 6 Kb dans les cellules CE mais pas dans toute une série de lignées différenciées. Par hybridation de la souche sur une banque d'ADN génomique dans le bactériophage lambda, 0,5 à 1 % des plaques contiennent ces séquences. Ce caractère répété est confirmé par une analyse de l'ADN génomique par la technique de transfert de Southern.

1) *Structure d'un clone génomique.* Plusieurs clones génomiques ont été analysés. L'un d'entre eux, MG1, a été sélectionné. Il présente deux fragments de restriction s'hybridant avec le cADN PMS 3. Un fragment de 6 Kb contenant ces deux répétitions a été sous-cloné dans le plasmide pBR322. Sa carte de restriction a été obtenue. Les fragments du cADN sont situés aux extrémités de ce plasmide (pMAC-2). La longueur de la répétition dans le génome de la souris est de l'ordre de 6 Kb. En effet, des fragments internes au plasmide pMAC-2 sont aussi répétés dans le génome et s'hybrident, de façon différentielle aussi, à l'ARN de 6 Kb dans les cellules CE. Finalement, dans le laboratoire d'Odile Croissant, on a pu montrer, d'une part que l'ARN est colinéaire à l'ADN de 6 Kb cloné dans pMAC-2 et d'autre part que les répétitions terminales aux extrémités des 6 Kb sont directes.

La séquence du cADN a été obtenue par la méthode de Maxam et Gilbert et comparée par ordinateur aux autres séquences répertoriées. Quelques homologies locales ont pu être décelées. Ces éléments ont une structure génomique qui est analogue à celle d'un rétrovirus intégré ou d'un élément transposable.

2) *Distribution génomique.* Par hybridation sur les chromosomes, on a établi que ces séquences étaient dispersées dans le génome. Une analyse par enzyme de restriction est en cours pour caractériser la famille et son état de méthylation.

3. *Expression dans les embryons précoces.* On a mis au point une technique d'hybridation *in situ* permettant de déceler l'ARN complémentaire sur des coupes d'embryons. Cet ARN est abondant dans les cellules de l'ICM et de l'ectoderme embryonnaire aux jours 6 et 7. Il est présent aussi dans certains tissus différenciés, par exemple l'ectoderme extra-embryonnaire, mais en quantité moindre. L'expression est faible ou nulle dans les stades préimplantation, le trophoctoderme, l'endoderme. Cette étude est poursuivie.

#### D. *L'uvomoruline : protéine membranaire extrinsèque de l'embryon de souris*

L'anticorps monoclonal de rat (DE1) dirigé contre un fragment tryptique de l'uvomoruline (gp84) permet d'immunoprécipiter l'uvomoruline en présence de calcium. On a ainsi identifié, dans un lysat de cellules PCC4 Aza R1 radiomarquées, deux produits majeurs de masses moléculaires 120 kDa et 100 kDa. Il s'est avéré qu'au cours des expériences d'immunoprécipitation la molécule de 120 kDa est dégradée en une famille de fragments plus légers, dont la molécule de 100 kDa.

La lyse, en présence de Triton X114, de cellules PCC4 Aza R1 radio-marquée et le fractionnement de ce lysat en phase aqueuse et phase détergent ont montré que la molécule de 120 kDa ne fixe pas de micelles de détergent. De plus, il ne semble pas que ce composé soit le résultat d'une dégradation pouvant intervenir au cours des processus expérimentaux. Ces résultats suggèrent que l'uvomoruline ne possède pas de domaine transmembranaire.

Des marquages de 10 min, suivis par différentes périodes de chasse, ont révélé un doublet de protéines de 135 kDa qui présentent le changement de conformation induit par le calcium caractéristique de l'uvomoruline. Le plus lourd composant du doublet est le seul présent après 15 min de chasse et disparaît au cours d'une chasse plus longue alors que la quantité de 120 kDa augmente. On peut en déduire que cette molécule, qui n'est sans doute pas exprimée à la surface de la cellule puisqu'elle a disparu au bout d'une chasse de 60 min, pourrait être un précurseur de l'uvomoruline. Le plus léger composant du doublet de 135 kDa se retrouve principalement dans la phase détergent d'un lysat TX 114 et semble donc avoir des propriétés amphipathiques.

Bien qu'il soit nécessaire de préciser les rapports existant entre les molécules de 135 kDa et 120 kDa, le fait qu'on puisse identifier des produits de masse moléculaire élevée exprimés transitoirement au cours de la biosynthèse de l'UM sont un autre argument en faveur du caractère hydrophile de la forme 120 kDa exprimée à la surface de la cellule.

L'expression de l'uvomoruline n'est pas limitée à l'embryon précoce. Grâce à la technique des immunorépliques, on a mis en évidence des molécules reconnues par DE1 et de masse moléculaire semblable à l'uvomoruline dans différents organes de souris à divers stades de développement. Des travaux ayant pour but d'établir les rapports existant précisément entre les différentes molécules mises en évidence aussi bien au cours des expériences de biosynthèse que dans les différents organes de souris sont en cours. On essaie également de mettre au point une méthode de purification de la forme 121 kDa observée dans le carcinome embryonnaire.

#### E. *Etablissement du phénotype polarisé dans la morula compacte*

La surface des blastomères de souris est sillonnée de digitations mobiles, les microvillosités. Jusqu'au stade 8 cellules, les microvillosités sont réparties au hasard sur toute la surface. Lors de la « compaction » de la morula (stade 8 - 16 cellules), elles vont se concentrer au pôle apical de certains blastomères ; ainsi sont créées deux sous-populations : cellules polarisées, situées à l'extérieur de la morula, cellules non polarisées, situées à l'intérieur. Les cellules externes polarisées donneront le lignage trophoblastique, les

cellules internes non polarisées, la masse cellulaire interne et ses dérivés. Johnson a émis l'hypothèse d'un lien causal entre la présence de cette calotte polarisée et la différenciation en trophoctoderme. On a cherché à analyser les constituants des microvillosités de l'embryon au stade de la morula compacte.

Des microvillosités très spécialisées existent dans l'intestin et le tubule rénal proximal des mammifères. En particulier, des molécules membranaires et sous-membranaires liées à l'actine et exprimées uniquement dans ces structures ont été purifiées et des anticorps préparés. Il se pourrait que certaines de ces molécules soient communes à tous les types de microvillosités. On a pu montrer qu'un antisérum (produit par Daniel Louvard) dirigé contre les microvillosités purifiées de rein de chien reconnaît en immunofluorescence des déterminants situés dans la membrane plasmique des cellules embryonnaires de souris à partir du stade 8 cellules. Le marquage augmente après la « compaction » de la morula et sur le trophoctoderme du stade blastocyste. Ces déterminants sont également décelés à la surface des cellules d'une lignée de trophoblastome dérivée du tératocarcinome murin. Les extraits de membrane du trophoblastome contiennent deux molécules de poids moléculaires apparent 200 Kd et 70 Kd qui sont reconnues par l'antisérum. L'identification de l'une de ces molécules avec les déterminants réagissant en immunofluorescence sur l'embryon est en cours.

Les déterminants sont décelés sur toute la surface des blastomères au stade 8 cellules. Cependant après « compaction » ils paraissent plus concentrés au niveau d'une zone de la membrane qui coïncide avec le pôle de microvillosités, mis en évidence par un marquage à la concanavoline. Cette calotte polarisée, visible sur environ 50 à 60 % des blastomères, disparaît lorsque ceux-ci sont placés à 0 °C. Il semble donc que certaines des structures constituant les microvillosités de l'embryon précoce soient détruites au froid.

### III. EXPRESSION PRÉCOCE DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES AU COURS DE L'ONTOGÈNE CHEZ LA SOURIS

(Michèle DARMON, Alain LILIEBAUM et Denise PAULIN)

#### A. Transition vimentine-neurofilaments

L'expression des neurofilaments (NF) et de la vimentine (Vim) a été étudiée au cours des jeunes stades de la différenciation du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) de la souris, par une technique d'immunofluorescence.

La Vim apparaît avant les NF dans les cellules précurseurs des neurones centraux et périphériques. La Vim est décelable dès 8,5 jours de gestation (E 8,5) dans le neuroépithélium et la crête neurale en migration. Les NF apparaissent à E 9 - E 9,5 au niveau céphalique, dans quelques cellules du tube nerveux et des ébauches des ganglions sensoriels crâniens. A E 10,5, les NF sont décelables dans la moelle épinière, dans les ganglions rachidiens, sympathiques et dans des neuroblastes intestinaux, les précurseurs des ganglions entériques. Dans les neuroblastes du système nerveux autonome, l'apparition des NF apparaît synchronisée avec celle de la tyrosine hydroxylase, marqueur spécifique de la différenciation adrénergique. Des études en double marquage ont permis de démontrer que les deux types de filaments intermédiaires, Vim et NF, coexistent dans les mêmes prolongements cellulaires pendant un bref laps de temps, ce qui suggère un remplacement progressif de la Vim par son homologue neuronal.

#### B. Détermination de la structure des neurofilaments à l'aide d'anticorps monoclonaux

Six classes d'anticorps monoclonaux avec des spécificités de reconnaissance différente ont permis de montrer que chacune des protéines des neurofilaments (70 k, 160 k, 210 k) possèdent un déterminant unique, un déterminant commun à deux des protéines, un déterminant commun à trois des protéines. Les spécificités sont mises en évidence par trois méthodes : RIA sur protéines natives, immunoblot sur protéines dénaturées et immunofluorescence sur coupe de tissus. Les anticorps monoclonaux qui réagissent avec plusieurs protéines des NF ne sont pas spécifiques d'une espèce. Ils sont de type IgM et reconnaissent système nerveux central et périphérique humain, bovin, murin. Les anticorps spécifiques d'un seul filament sont de type IgG et ne donnent aucune réaction croisée. La coupure en fragments de NF par les enzymes protéolytiques (protéase V 8 ou chymotrypsine) montre une région commune à tous les filaments qui porte le déterminant commun. Les anticorps qui réagissent avec les NF permettent de caractériser des tumeurs neuronales humaines en distinguant neuroblastome d'astrocytome.

#### C. ARN messagers codant pour les protéines des NF

Des ARN messagers extraits de cerveaux de souris adultes et de souriceaux nouveau-nés ont été traduits *in vitro* et analysés en gels bidimensionnels. Ces études ont montré la présence de messagers spécifiant la protéine de 70 k des neurofilaments. L'identification de la protéine a été confirmée par l'analyse de la carte peptidique du produit de traduction. L'analyse quantitative a montré que le message codant pour la 70 k des neurofilaments représente

0,1 % des messagers totaux dans le cerveau adulte et 0,05 % des messagers totaux dans le cerveau de souris tant dans les préparations d'ARN poly-somal que dans les préparations d'ARN poly A<sup>+</sup> total.

*D. Variation d'expression de la vimentine dans les cellules hématopoïétiques humaines*

En collaboration avec K. Dellagi, W. Vainchenker, G. Vinci et J.C. Brouet, on a entrepris une étude systématique de la synthèse de la vimentine dans les cellules hématopoïétiques en fonction du stade de différenciation. Les résultats obtenus sur les cellules humaines montrent que l'expression de la vimentine est différente dans les cellules des lignées hématopoïétiques et que dans une voie donnée, la synthèse et l'expression du filament de vimentine varie avec le stade de maturation atteint par la cellule. Les monocytes sont extrêmement riches en vimentine quand ils sont mûrs alors que leurs pré-curseurs, caractérisés par un anticorps antimyéloïde (MAb 80 H5) (stade prémyélocyte), ne le sont pas. Dans les cellules granulocytaires, un unique filament de vimentine entoure le noyau. Ces deux classes de cellules partagent pourtant un certain nombre de propriétés telles que l'adhérence, la mobilité et la phagocytose.

Lors de la maturation des cellules érythroïdes, la vimentine disparaît complètement et les cellules rouges n'en contiennent pas du tout. Etant donné qu'une connexion du réseau de vimentine avec le noyau cellulaire a été démontrée, la question de la corrélation entre disparition de la vimentine et l'expulsion du noyau reste posée.

Les plaquettes et la plupart des mégacaryocytes n'expriment pas la vimentine. Ce résultat est à comparer avec ceux obtenus dans les études sur leucémies humaines (résultats non publiés, BROUET *et al.*) issues des lignées mégacaryocytaires qui, dans 2 cas sur 6, présentent un réseau filamenteux de vimentine extrêmement dense. Etant donné que l'on admet que les leucémies correspondent à une prolifération cellulaire dans un état donné, on peut supposer que les deux lignées positives sont issues de mégacaryoblastes très précoces.

D'autre part, l'étude d'une centaine de sérums obtenus de patients atteints de leucémie de Waldenstrom montre qu'un très grand nombre d'entre eux réagissent avec un ou des polypeptide(s) caractéristique(s) des filaments intermédiaires. Dans tous les cas positifs, le polypeptide qui porte l'activité est la vimentine et dans quelques cas cette activité est partagée avec d'autres polypeptides tels que la desmine, la GFA, ou les kératines, et plus rarement avec d'autres protéines du cytosquelette telles que l'actine ou la myosine. Ces résultats s'élèvent à 5 - 10 % des patients porteurs de macroglobulinémie.

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

(Hubert CONDAMINE)

Les chromosomes t de la souris sont des chromosomes 17 particuliers trouvés dans les populations naturelles et dont les caractéristiques majeures ont été rappelées dans le rapport de l'année précédente. On a poursuivi l'analyse sérologique de chromosomes recombinants formés à la suite d'un échange entre un chromosome « normal » (issu d'une souris de laboratoire) et un chromosome t dans la région T - tf. L'intérêt d'une telle analyse apparaît si l'on se rappelle que des données ont été obtenues menant à penser que les gènes du complexe d'histo-compatibilité majeur (H-2) sont en position anormale dans le chromosome t à environ 6 cM à gauche du locus tf, au lieu de la localisation à 8 cM à droite de tf, classiquement reconnue dans les chromosomes 17 de laboratoire. Dès lors, la recombinaison dans la région T - tf entre chromosome t et chromosome normal devrait engendrer des chromosomes porteurs d'un complexe H-2 ou, au contraire, de 0 ou 2 complexes H-2, selon que le cross-over passe à gauche ou à droite de la région H-2<sup>t</sup>. Or des données de la littérature montrent que les trisomies et les monosomies du chromosome 17, et spécifiquement celles intéressant la région H-2, sont létales respectivement vers le 10<sup>e</sup> jour et le 3<sup>e</sup> jour de l'embryogenèse. Il s'ensuit qu'on ne devrait pas pouvoir récupérer des chromosomes recombinants à 0 ou 2 H-2. L'étude en cours qui concerne six recombinants indépendants obtenus à partir de quatre chromosomes t distincts, donne à penser que chacun de ces recombinants est en effet porteur d'un seul locus H-2, même lorsque l'échange est situé dans une région telle qu'il devrait entraîner, sauf cas de cross-over multiples, un chromosome à 2 H-2. La règle énoncée ci-dessus semble donc être respectée jusqu'à maintenant. Du même coup, il se pourrait qu'on tienne là une des causes de la réduction drastique qu'entraînent les chromosomes t dans la recombinaison au long du chromosome 17. Cette réduction pourrait, au moins pour partie, n'être qu'apparente et résulter de l'impossibilité où l'on se trouverait de récupérer certains produits de recombinaison.

#### PUBLICATIONS

M. DARMON, *Laminin provides a better substrate than fibronectin for attachment, growth and differentiation of 1 003 embryonal carcinoma cells (In vitro, 18, 997-1003, 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).*

N. FOREST, M.L. BOY-LEFEVRE, P. DUPREY, J.A. GRIMAUD, H. JAKOB et D. PAULIN, *Collagen synthesis in mouse embryonal carcinoma cells : effect of retinoic acid* (*Differentiation*, 22, 153-163, 1982).

P. BRÛLET, H. CONDAMINE et F. JACOB, *Murine teratocarcinoma and the identification of developmentally relevant molecules* (*Cancer Surveys*, 2, 93-113, 1983).

F. JACOB, *Molecular tinkering in evolution. In : « Evolution from molecules to men »*. D.S. Bendall éd., Cambridge University Press, Cambridge, 131-144, 1983.

F. HYAFIL, C. BABINET, C. HUET et F. JACOB, *Uvomorulin and compaction. Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation (Teratocarcinoma stem cells*, 10, 197-207, 1983).

F. JACOB, *Concluding remarks. Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation (Teratocarcinoma stem cells*, 10, 197-207, 1983).

O. BENSUADE, C. BABINET, M. MORANGE et F. JACOB, *Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in the mouse embryo* (*Nature*, 305, 331-333, 1983).

P. BRÛLET, M. KAGHAD, Y.S. XU, O. CROISSANT et F. JACOB, *Early differential tissue expression of transposon-like repetitive DNA sequences of the mouse* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 5641-5645, 1983).

N. PEYRIERAS, F. HYAFIL, D. LOUVARD, H.L. PLOEGH et F. JACOB, *Uvomorulin : a non-integral membrane protein of early mouse embryo* (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 6274-6277, 1983).

C. ZILLER, E. DUPIN, P. BRAZEAU, D. PAULIN et N. LE DOUARIN, *Early segregation of a neuronal precursor cell line in the neural crest as revealed by culture in a chemically defined medium* (*Cell*, 32, 627-638, 1983).

B. MARO, M.E. SAURON, D. PAULIN et M. BORNENS, *Further evidence for interaction between microtubules and vimentin filaments : taxol and cold effects* (*Biol. Cell.*, 47, 243-246, 1983).

O. BENSUADE et M. MORANGE, *High spontaneous expression of heat shock proteins in mouse embryonal carcinoma cells* (*The E.M.B.O. Journal*, 2, 173-177, 1983).

B. EDDE, H. JAKOB et M. DARMON, *Two specific markers for neural differentiation of embryonal carcinoma cells* (*The E.M.B.O. Journal*, 2, 1473-1478, 1983).

K. DELLAGI, W. VAINCHENKER, G. VINCI, D. PAULIN et J.C. BROUET, *Alteration of vimentin intermediate filament expression during differentiation of human hemopoietic cells* (*The E.M.B.O. Journal*, 2, 1509-1514, 1983).

M. DARMON et G. SERRERO, *Isolation of two different fibroblastic cell types from the embryonal carcinoma cell line 1003. Study of tumorigenic properties, surface antigens, and differentiation responses to 5-azacytidine and dexamethasone. Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation (Teratocarcinoma stem cells, 10, 109-119, 1983).*

M. VASSEUR, M. KATINKA et C. MARLE, *Infection of F9 cells with polyoma EC mutants : Possible role for DNA secondary structures in the control of polyoma virus expression in embryonal carcinoma cells. Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation (Teratocarcinoma stem cells, 10, 259-269, 1983).*

M.H. BUC-CARON, M. DARMON, M. POIRET, C. SELLEM, J.M. SALA-TREPAT et T. ERDOS, *Analysis of  $\alpha$ -fetoprotein and albumin gene expression in teratocarcinoma cells. Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation (Teratocarcinoma stem cells, 10, 411-420, 1983).*

B. BARON, P. METEZEAU, F. KELLY, A. BERNHEIM, R. BERGER, H. JAKOB, J.L. GUENET et M. GOLDBERG, *Etude de translocations et de fusions de chromosomes chez la souris par cytométrie de flux : tri des chromosomes X et Iso 1 (Biol. Cell., 49, 2a, 1983).*

F. ALFONSI, N. FOREST, F. GOSSELIN, D. JANKEVIC, B. MARIN-CUDRAZ, J.C. MAZIE et D. PAULIN, *Homologies structurales entre les protéines du triplet de neurofilaments démontrées à l'aide d'anticorps monoclonaux (Biol. Cell., 49, 35a, 1983).*

J. PERREAU et D. PAULIN, *Variation de l'expression de la vimentine dans des lignées embryonnaires et dans les dérivés différenciés (Biol. Cell., 49, 18a, 1983).*

J.F. NICOLAS et P. BERG, *Regulation of expression of genes transduced into embryonal carcinoma cells. Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation (Teratocarcinoma stem cells, 10, 469-485, 1983).*

P. BRÛLET et W.G. ROSKAM, *Improved method for cloning DNA complementary to minor RNAs : preparation of a hybridization probe from purified mRNAs encoding intermediate filament proteins (Gene, 22, 59-68, 1983).*

P. BRÛLET, *Molecular probes to study the first differentiation in the mouse embryo. Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation (Teratocarcinoma stem cells, 10, 403-409, 1983).*

Y.S. XU et P. BRÛLET, *Cytoplasm distribution of an RNA, specific for mouse embryonal carcinoma cell lines (Chinese) (Zoological Research, 4, 295-305, 1983).*