

Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Cette année, le cours a porté sur certains aspects cellulaires et moléculaires de l'embryogenèse précoce chez la Souris.

Pour des raisons évidentes, c'est surtout chez la *Drosophile* que s'est épanouie l'étude génétique du développement. Chez la Souris, au contraire, cette étude n'a pu prendre le même essor, les techniques génétiques utilisées chez la *Drosophile* n'étant pas applicables. Cependant, certains résultats récents obtenus chez la *Drosophile* donnent l'espoir d'accéder, par la génétique moléculaire, à une classe de gènes impliqués dans le développement de la Souris. On a donc commencé par exposer ces résultats.

On connaît trois classes de mutations qui modifient la construction du corps de la *Drosophile*.

1) Des mutations qui modifient la polarité des axes du corps, comme *bicaudal*, qui produit un individu sans tête à deux extrémités caudales, ou *bicéphalique* qui entraîne le phénotype inverse.

2) Des mutations qui modifient la division du corps en segments et par conséquent le nombre des segments, comme *fushi tarazu* (qui signifie « pas assez de segments ») : la moitié postérieure de chaque segment pair et la moitié antérieure de chaque segment impair restent fusionnées ce qui entraîne un nombre de segments égal à la moitié de la normale.

3) Des mutations qui modifient le développement de chaque segment. On connaît de nombreuses mutations de ce type, appelées homéotiques. Deux régions du génome de la *Drosophile* dont les mutations entraînent des modifications homéotiques ont été particulièrement étudiées : le complexe *Bithorax*, dont les mutations modifient la structure des segments du thorax et de l'abdomen. Le complexe *Antennapedia*, dont certaines mutations modifient la structure des segments de la tête et du thorax antérieur.

Au prix d'un immense travail effectué dans plusieurs laboratoires, l'ADN correspondant aux complexes *Bithorax* et *Antennapedia* a pu être isolé,

purifié et reproduit en grande quantité. Il s'agit de segments d'ADN de taille considérable puisque chacun des deux complexes correspond à plus de 100 kilobases. A l'aide de cet ADN, il devient possible d'effectuer toute une série d'expériences et notamment :

— d'étudier la structure moléculaire des mutations survenues dans l'un ou l'autre de ces complexes ; on s'est ainsi aperçu que la plupart des mutations survenues spontanément correspondent, non pas au changement d'une base, mais à un remaniement chromosomique, transposition, inversion et surtout insertion d'éléments mobiles de type *copia* ;

— d'étudier la structure des gènes contenus dans chacune de ces régions ; gènes le plus souvent de grande taille, contenant plusieurs introns ce qui est exceptionnel chez la *Drosophile* ;

— d'étudier la structure des ARN messagers produits par ces régions ; il s'agit le plus souvent de structures complexes, des messagers différents étant produits par une même région génomique grâce à des mécanismes d'épissage différentiel ;

— d'étudier la distribution des messagers dans le temps et dans l'espace par des expériences d'hybridation *in situ* ; on s'aperçoit ainsi que, dans les deux ou trois cas étudiés en détail, ces messagers sont repérables seulement pendant la période et dans la région attendues d'après le phénotype entraîné par la mutation ;

— de préciser la séquence de ces gènes. On s'est alors aperçu d'une particularité très remarquable. Plusieurs des gènes étudiés en détail présentent, près de la région 5' du dernier exon, une même séquence de 180 paires de base, correspondant à une phase de lecture ouverte donnant une séquence de vingt acides aminés extrêmement conservés dans les deux régions. Cette séquence a été désignée sous le nom de *boîte homéotique*. En utilisant comme sonde cette boîte homéotique, il a été possible de repérer d'autres gènes de la *Drosophile* qui contiennent également cette séquence. Les premières études semblent indiquer que ces gènes pourraient bien, eux aussi, intervenir dans certaines étapes précoces de la construction de la mouche.

Plus remarquable encore, le fait suivant : en utilisant cette sonde homéotique dans des conditions de contrainte faible, on observe la présence de gènes capables de s'hybrider avec ces sondes dans toute une série d'organismes invertébrés et vertébrés. Notamment chez le Xénope, la Souris et l'Homme. Un grand nombre de laboratoires sont ainsi occupés à isoler de tels gènes, en particulier chez la Souris et chez l'Homme. En outre, il est apparu que certains éléments de la séquence homéotique s'apparentent étroitement à des séquences régulatrices de la levure. Il est encore trop tôt pour connaître le rôle que ces gènes jouent chez les Mammifères. Il se pourrait qu'ils offrent un accès nouveau aux mécanismes régulateurs de l'embryogenèse.

On est ensuite revenu à certains aspects de la génétique de la Souris. On peut notamment se demander dans quelle mesure une bonne fraction des mutations spontanées est due, chez la Souris comme chez la *Drosophile*, à des insertions de transposons. Aucun transposon n'a encore été décrit chez la Souris. On a discuté un certain nombre de situations où les propriétés d'une mutation, en particulier sa fréquence élevée de réversions, peuvent faire penser à l'insertion réversible d'un élément génétique de type transposon dans le génome de la Souris. Aucun de ces cas ne semble concluant.

En revanche, la situation apparaît beaucoup plus claire avec les rétrovirus de la Souris. Les virus endogènes de la leucémie murine (MuLV) peuvent être classés en trois catégories :

- Virus *écotropiques* qui infectent seulement des cellules de Souris.
- Virus *xénotropiques* qui infectent seulement des cellules d'autres espèces.
- Virus *amphotropiques* qui infectent à la fois des cellules de Souris et d'autres espèces.

Dans tous les cas l'ADN proviral des MuLV intégrés a une structure semblable à celle des transposons. Il possède en particulier de longues terminaisons répétitives (LTR) directes terminées, à chaque bout, par de courtes répétitions inversées. En outre, de courtes séquences d'ADN cellulaire sont dupliquées pendant l'intégration et flanquent de part et d'autre chaque provirus. Ces rétrovirus, ainsi que les transposons, peuvent fonctionner comme mutagènes par insertion dans une unité génétique qu'ils interrompent.

Une étude systématique a été entreprise par le groupe de Jenkins et de Copeland pour rechercher dans 54 lignées de Souris, la présence de MuLV écotropiques intégrés. Sur ces 54 lignées, 42 possèdent au moins un provirus intégré repérable avec une sonde de 400 paires de base provenant du gène « enveloppe » (env) d'un rétrovirus présent dans la lignée AKR. 30 de ces lignées ont un seul provirus, les 12 autres de 2 à 6. Au total, on peut mettre en évidence au moins 29 sites d'intégration différents. Mais, à ce jour, il n'y a guère d'arguments pour penser que de tels provirus MuLV puissent être transposés d'un site à un autre dans le génome de Souris. Dans deux mutations de la Souris, *Dilute* et *Lethal Yellow*, Copeland et Jenkins ont pu mettre en évidence un virus MuLV dont la présence semble bien être la cause de la mutation.

On peut donc essayer d'utiliser un virus MuLV comme mutagène. Les premiers essais ont été effectués en culture de cellules par Hayward et collaborateurs puis par Varmus et collaborateurs. Les arguments les plus convaincants ont été apportés par Jaenisch et ses collaborateurs par infection d'embryons avec un virus MuLV et analyse des Souris issues de ces embryons. Il a pu être montré, en effet, que après infection d'embryons à des stades

précoces, le génome viral s'intègre et apparaît dans la lignée germinale. On peut donc obtenir des lignées où le virus est inséré de manière stable dans des sites chaque fois différents.

A partir d'une de ces lignées, hétérozygote pour un virus intégré dans un site donné, on peut obtenir des animaux homozygotes. Sur une douzaine de lignées, onze produisent des homozygotes viables. L'une cependant n'en produit pas. Les embryons homozygotes se comportent comme des porteurs d'une mutation récessive létale qui interrompt le développement au début du jour 13 de la vie intra-utérine. L'analyse détaillée de ce provirus montre que le génome viral s'est inséré dans le gène déterminant la structure du collagène $\alpha 1$ (I). La mort des embryons paraît due à une extrême fragilité des vaisseaux qui ne contiennent pas de collagène $\alpha 1$ (I) et se rompent, entraînant une mort subite.

On voit donc que les rétrovirus peuvent être utilisés chez la Souris comme agent mutagène. Cependant, l'efficacité du processus est encore faible. Il est probable que la technique pourra être améliorée dans les années à venir. La possibilité d'insérer des virus dans diverses régions du génome, donc d'obtenir à la fois des mutations et des sondes moléculaires de la région, devrait offrir des perspectives nouvelles pour l'étude génétique du développement chez la Souris.

F. J.

SÉMINAIRES

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

M. Roger BERTOLOTTI, Chargé de recherches au C.N.R.S., a fait une conférence sur : Différenciation cellulaire : gènes programmeurs et ligands histospécifiques.

M. Olivier BRISON, Chargé de recherches au C.N.R.S., a donné un séminaire sur l'amplification génique dans les cellules eucaryotes.

M. François DAUTRY, Chargé de recherches au C.N.R.S., a décrit les mécanismes d'activation des gènes *ras* et du gène *myc* dans les tumeurs.

M. André ADOUTTE, Professeur à l'Université de Paris XI, a proposé un exposé sur : Cytosquelette, membrane et morphogenèse chez la Paramécie.

M. Eric KARSENTI, Chargé de recherches au C.N.R.S., a fait le point sur l'établissement de la polarité dorso-ventrale dans l'embryon de Xénope.

M. Marcel MECHALI, Chargé de recherche au C.N.R.S., a traité le sujet : Réplication et expression du génome pendant le développement précoce du Xénope.

M. Moshe YANIV, Directeur de recherches au C.N.R.S., a discuté la régulation de la transcription dans les cellules eucaryotes.

M. Maurice WEGNEZ, Professeur à l'Université de Paris XI, a exploré la question : La synthèse des métallothionines est-elle régulée au cours du développement ?

M. François RIEGER, Maître de recherches au C.N.R.S., a décrit le développement du système neuromusculaire de la Souris normale et *muscular dysgenesis*.

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. Comme précédemment, 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 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 cinq 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. ÉTUDE DE LA RÉGULATION DES GÈNES PAR TRANSFORMATION D'EMBRYONS ET DE CELLULES DE CARCINOME EMBRYONNAIRE (CE)

(Odile KELLERMANN, Jean-François NICOLAS et John R. RUBENSTEIN)

L'objectif est de mettre au point des vecteurs viraux permettant, par simple infection, d'exprimer des gènes dans les embryons de la souris. Cela ouvrira la possibilité d'agir d'une manière contrôlée sur le développement de l'embryon et d'étudier la régulation de gènes introduits dans les rétrovirus recombinants durant l'embryogenèse.

De plus, on voudrait explorer les possibilités ouvertes par nos récents travaux montrant que la production d'ARN transcrit à partir du brin non

codant d'un gène donné (anti-messenger) diminue dans des proportions considérables l'expression de ce gène. En effet, cette approche pourrait servir à obtenir des phénocopies de mutants dans l'embryon autrement impossibles à sélectionner.

A. Les vecteur rétroviraux

Des vecteurs rétroviraux permettant d'infecter les cellules somatiques en culture ont été développés par plusieurs groupes. En général, ces virus sont défectifs et les gènes transduits sont exprimés en utilisant la machinerie du virus (promoteur, signaux d'épissage et de polyadénylation). Ces rétrovirus recombinants présentent des avantages considérables sur les vecteurs bactériens : (1) en tant que virus, ils permettent d'infecter 100 % des cellules traitées, (2) en tant que rétrovirus, ils s'intègrent sous forme de provirus dans le génome des cellules hôtes en utilisant les LTR.

Cependant, Jaenisch a montré que si les rétrovirus infectent les cellules de l'embryon, ils y sont probablement inactivés très précocement.

Notre première tâche a donc été de modifier les rétrovirus recombinants de telle manière que non seulement ils s'intègrent dans le génome des cellules CE, mais aussi qu'ils y expriment les gènes transduits. Cela a été accompli en introduisant un second promoteur en 5' du gène transduit. Ce second promoteur sert à la transcription de gènes correctement positionnés dans le rétrovirus défectif. Il n'interfère pas avec la production du virus dans les cellules productrices. De plus, l'expression de ces gènes est stable dans les cellules CE. Ces constructions devraient donc permettre la transduction et l'expression stable de gènes dans toutes les cellules de l'embryon.

B. L'utilisation d'ARN non-sens pour inhiber l'expression des gènes

Trois séries de travaux ont récemment soulevé l'hypothèse selon laquelle la présence d'ARN transcrit sur le brin non-sens d'un gène inhibait son expression. Izant et Weintraub ont montré qu'un plasmide où l'orientation de la partie codante de la thymidine-kinase est inversée, est capable d'inhiber la thymidine-kinase produite par un plasmide tk. Melton a montré que l'introduction simultanée dans l'œuf d'amphibien d'ARN messenger codant pour la β -globuline et d'ARN complémentaire (synthétisé *in vitro*) inhibait complètement la production de la protéine.

Pour notre part, nous avons montré d'une manière quantitative que la présence de plasmides non-sens (capables de transcrire le brin complémentaire de la β -galactosidase ou le gène néo d'*E.coli* dans les cellules eucaryotes) inhibait à 90 % l'expression des plasmides sens correspondants. Un faible excès du plasmide non-sens est suffisant. La transcription de la totalité

de la chaîne complémentaire n'est pas nécessaire pour obtenir l'inhibition. Enfin, l'inhibition est spécifique : elle n'affecte pas l'expression d'autres gènes. Elle n'est pas non plus due à des événements de recombinaisons homologues entre les ADN des deux plasmides.

Des tentatives d'inhibition de l'expression de gènes intégrés au génome des cellules sont en cours en utilisant des rétrovirus codant pour des messagers non-sens.

C. Utilisation des virus oncogènes à ADN dans l'étude des mécanismes d'expression génétique associés à la différenciation des cellules de carcinome embryonnaire et chez l'embryon de souris

On a cherché à utiliser l'adénovirus et certains de ses éléments de contrôle de transcription et (promoteur-activateur) pour faire exprimer des gènes dans les cellules de carcinome embryonnaire et dans l'embryon de souris. L'adénovirus, en effet, s'exprime dans les cellules de carcinome embryonnaire ainsi que dans ses dérivés différenciés, contrairement à SV40, au virus du polyome et aux rétrovirus murins qui ne s'expriment que dans les cellules différenciées.

Dans un premier temps, on a choisi d'étudier l'expression sous contrôle du promoteur E1A de l'adénovirus du gène codant pour l'antigène T de SV40 décelable aisément au niveau cellulaire par immunofluorescence indirecte ; par la suite, on utilisera d'autres gènes susceptibles de modifier la différenciation et la prolifération cellulaire tels que H-2, des oncogènes cellulaires ou des gènes codant pour les filaments intermédiaires.

1. *Expression de plasmides recombinants adéno-SV40 dans les cellules de tératocarcinome.*

a) *Construction des plasmides.*

On a construit, en collaboration avec Michel Péricaudet (I.R.S.C., Villejuif) un plasmide recombinant (PK4) dans lequel la région précoce de SV40 a été placée sous le contrôle du promoteur précoce E1A de l'adénovirus de type 5. Le gène E1A est un gène précoce qui s'exprime en principe de façon constitutive, en l'absence d'autres facteurs viraux. Deux dérivés de ce plasmide ont été obtenus par insertion de la séquence activatrice de SV40 en amont et en aval de la construction. Après transfection de l'ADN de ces plasmides dans les cellules Hela et dans plusieurs lignées de cellules de carcinome embryonnaire, on observe une expression transitoire de l'antigène T.

b) *Analyse de l'expression des gènes intégrés dans des lignées CE.*

Par cotransformation des cellules F9 (CE) avec le plasmide SV₂TKneo β qui contient le gène de résistance à la néomycine et sélection de clones résistants au G418, on a isolé des lignées de carcinome embryonnaire qui ont intégré les plasmides recombinants adéno-SV40 (Analyse du DNA intégré par la méthode de Southern).

Les lignées F9 transformées ne contiennent que peu ou pas d'antigène T à l'état CE alors qu'après induction de la différenciation l'antigène T est fortement exprimé. Le promoteur E1A et les régions de contrôle adjacentes de l'adénovirus ne permettent pas la transcription optimale de la région précoce de SV40 dans les cellules non différenciées. Cela suggère que différents éléments de régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle sont mis en jeu dans ces cellules de carcinome embryonnaire.

Afin de préciser ceux-ci, il est nécessaire de faire une étude détaillée de la transcription en fonction de l'état de différenciation des cellules.

2. *Utilisation de virus hybrides adéno-SV40 comme vecteurs et comme agents transformants.*

En collaboration avec Michel Péricaudet (I.R.S.C., Villejuif), on a intégré dans le génome de l'adénovirus de type 5 la région précoce de SV40 sous le contrôle du promoteur E1A. Des stocks de virus hybrides défectifs pour le gène E1A peuvent être obtenus dans la souche 293 constitutive pour la région E1.

Nous utiliserons ces virus :

- comme vecteur pour introduire la région précoce de SV40 dans le tératocarcinome avec une haute efficacité ;
- comme agent transformant pour établir des lignées cellulaires, en particulier de cellules humaines ;
- comme vecteur pour réaliser sans microinjection des expériences sur l'embryon de souris (en collaboration avec C. Babinet, Institut Pasteur, Paris).

3. *Introduction des recombinants adéno-SV40 dans l'embryon de souris afin d'étudier leur expression au cours du développement.*

10 embryons ont été obtenus qui s'étaient développés à partir d'œufs injectés avec le plasmide recombinant adéno-SV40. Dans 2 embryons sur 5 dont le DNA a été analysé après mise en culture, on retrouve des copies de l'ADN injecté. Dans l'une de ces cultures, la présence d'antigène T a été révélée par immunofluorescence indirecte.

La recherche de souris transgéniques se poursuit. L'expression de l'antigène T dans les cellules embryonnaires pourrait en effet permettre d'isoler des lignées cellulaires utiles pour l'étude de la différenciation dans l'embryon de souris.

D. Modulation de l'expression de gènes introduits dans des cellules de carcinome embryonnaire (CE) à l'aide de DNA exogène

On a étudié l'expression de 2 gènes bien caractérisés antérieurement [la xanthine-phosphoribosyl-transférase XPRT bactérienne et l'aminoglycoside (3')-phosphotransférase, APH(3')II, conférant la résistance à la généticine, (néo^R)] dans des cellules multipotentielle de carcinome embryonnaire (PCC3). L'intégration de ces 2 gènes dans le DNA chromosomique avait été étudiée antérieurement. Les cellules n'expriment plus les produits des 2 gènes lorsqu'elles sont cultivées en absence de milieu sélectif alors que le DNA correspondant est toujours présent dans le génome, sans modification apparente. On a pu obtenir la réexpression de ces 2 gènes par traitement avec la 5-azacytidine. La sélection des cellules CE réexprimant les activités enzymatiques a été effectuée en milieu contenant la généticine.

1) Dans la majorité des cas étudiés, on observe une co-réactivation des 2 activités enzymatiques bien que la sélection soit effectuée seulement en milieu G418.

2) L'expression quantitative de chacune des 2 enzymes a été mesurée dans un grand nombre de clones différents. Comparées à celles de la souche d'origine, les activités varient fortement d'un clone à l'autre et sont soit de beaucoup supérieures ou inférieures à celles de la souche initiale.

3) Dans la plupart des cas, bien que les 2 enzymes soient réexprimées, leur niveau quantitatif d'expression n'est presque jamais coordonné : dans un même clone, l'APH(3') peut être à un niveau très élevé, la XPRT à un niveau très bas. La variabilité existe de clone à clone à l'intérieur d'une même souche.

4) L'étude de la méthylation d'un certain nombre de clones exprimant les 2 enzymes à des niveaux différents est en cours. L'état de déméthylation des gènes semble complexe. Il est plus ou moins constant pour les clones d'une souche donnée mais ne semble pas présenter de corrélation avec le niveau quantitatif d'expression des gènes.

5) Les souches contenant un seul ou plusieurs exemplaires de ces gènes donnent les mêmes fréquences de cellules réactivées, environ 2, pour 10⁴ cellules.

La 5-azacytidine semble entraîner, outre la déméthylation du DNA au niveau du gène, d'autres modifications plus indirectes que nous tentons de mettre en évidence.

II. ÉTUDE DE LA DIFFÉRENCIATION IN VITRO

(Marie-Hélène BUC, Hedwig JAKOB)

A. *Immortalisation et différenciation de cellules CE transformées par des recombinants adéno-SV40*

La différenciation sur gélatine en présence d'acide rétinoïque et d'AMPc d'une lignée F9 (K4b2) ayant intégré les plasmides a permis d'immortaliser une dizaine de clones différenciés dans lesquels s'exprime fortement l'antigène T de SV40.

La plupart de ces clones maintenus en culture pendant plusieurs mois ont un phénotype stable d'endoderme pariétal. Des techniques d'immunofluorescence indiquent que les cellules expriment divers antigènes spécifiques de ce tissu, troma-1, troma-3, collagène IV, laminine ; alors qu'elles n'expriment plus l'antigène ECMA 7 (spécifique des CE) présent dans la lignée non différenciée K4b2.

Les clones d'endoderme pariétal injectés dans des souris syngéniques irradiées produisent des tumeurs dont les cellules après mise en culture *in vitro* expriment fortement l'antigène T. Nous étudions les propriétés de différenciation et de croissance de ces cellules tumorales, corrélativement à l'examen en anatomopathologie et en microscopie électronique des tumeurs issues de ces clones (J. Gaillard, Institut Pasteur).

D'autres lignées différenciées négatives pour les marqueurs du carcinome embryonnaire et de l'endoderme pariétal ont été isolées, leur caractérisation est en cours. Ces lignées expriment également à un haut niveau l'antigène T et produisent des tumeurs chez l'animal.

Nous examinons si l'expression de l'antigène T au cours de la différenciation peut permettre d'isoler des dérivés différenciés qui n'existent pas à présent à l'état de lignée cellulaire. L'immortalisation de nouveaux dérivés du tératocarcinome pourrait permettre d'analyser plus séquentiellement les différents événements qui aboutissent à l'établissement du phénotype différencié et d'aborder certains problèmes de détermination.

B. *Isolement de lignées cellulaires totipotentes à partir d'embryons de souris mutantes présentant une pathologie musculaire.*

En collaboration avec F. Rieger, nous essayons d'isoler des lignées de cellules EK directement à partir d'embryons de souris mutantes mdg (muscular dysgenesis). Une première série d'embryons (peu nombreux) ont été

mis en culture mais pour l'instant n'ont pas donné de lignée EK. De telles cultures seront de nouveau entreprises et nous espérons obtenir des souches capables de se différencier entre autres en tissus musculaires. La localisation chromosomique du gène *mdg* est en cours dans le laboratoire de J.L. Guénet.

C. *Etude de la polarisation des blastomères*

Au stade 8 cellules, d'importantes réorganisations intra- et intercellulaires conduisent à la compaction de l'œuf de souris et à la polarisation de tous ses blastomères. On a recherché des molécules spécifiques des structures polarisées de l'embryon précoce, en particulier au sein des microvillosités polarisées de la morula compactée, mais aussi dans le trophoctoderme et dans l'endoderme viscéral, épithélium polarisé fonctionnel issu de la 2^e différenciation de l'embryon. On a utilisé des anticorps préparés contre des structures hétérologues hautement polarisées (microvillosités de la bordure en brosse du tubule rénal proximal) afin de mettre en évidence d'éventuels constituants communs à ces structures et aux épithéliums polarisés de l'embryon précoce.

1. *Antigènes décelés grâce à un sérum total antimicrovillosités de rein (sérum anti-MVDK).*

Ce sérum complexe ne reconnaît que 2 protéines dans des extraits membranaires du trophoblastome TDM soumis à une électrophorèse bidimensionnelle. Ces protéines, de poids moléculaire apparent 200 et 250 kd ne correspondent pas à des constituants déjà répertoriés au cours du développement embryonnaire. Par immunofluorescence sur l'embryon, nous avons montré que les déterminants antigéniques apparaissent au stade 8 non compacté et se distribuent à la fois dans la masse cellulaire interne et dans le trophoctoderme. Après implantation, ils sont retrouvés uniquement sur les dérivés endodermiques. La séquence précise d'apparition de chacun des 2 constituants a été suivie du stade morula jusqu'au jour 7 de l'embryogenèse par comigration électrophorétique (gels 2 d) d'extraits d'embryons radioactifs et d'extraits de membrane de trophoblastome. On a ainsi pu établir que les 2 taches décelées par l'antisérum dans les membranes de tératocarcinome correspondent exactement à 2 taches radioactives présentes dans l'embryon dès le stade 8 cellules. Les 2 taches sont présentes dans le blastocyste total alors qu'une seule est visible dans la masse cellulaire interne isolée. Après implantation, les 2 taches sont retrouvées dans un extrait total d'embryon jour 7 mais ont ségrégué entre l'endoderme viscéral du sac vitellin et l'endoderme pariétal. Des anticorps polyclonaux dirigés contre chacun des constituants ont été obtenus et leur analyse est en cours.

2. Antigènes embryonnaires reconnus par un sérum anti-GP 330.

Une glycoprotéine abondante présente dans les microvillosités de rein de souris a été purifiée par Kerjaschki et coll. Il s'agit d'un récepteur à un signal inconnu capable d'endocytose via des vésicules à clathrine. Ce récepteur est la cible d'auto-anticorps qui apparaissent dans la néphrite dite de Heymann. On a pu montrer par immunofluorescence sur l'embryon que des structures identiques ou présentant des réactions croisées sont décelées à la surface des cellules du trophoctoderme où elles subissent une endocytose rapide en présence de l'anticorps. Elles sont absentes de la masse cellulaire interne et sont retrouvées, après implantation, uniquement sur l'endoderme viscéral. Le marquage est confiné au pôle apical des cellules. Le sérum anti-GP 330 précipite dans des extraits de TDM une bande intense vers 330 kd ainsi que 2 autres bandes. Leur relation avec la bande de 330 kd et les constituants décelés par le sérum anti-MVDK est à l'étude par protéolyse ménagée des immunoprécipités.

III. ÉTUDE DE LA DIFFÉRENCIATION IN VIVO

(Olivier BENSUADE, Patrice BLANCHET, Philippe BRÛLET, Philippe DUPREY, François JACOB, Mourad KAGHAD, Laurence MAILLET, Valérie MEZGER, Michel MORANGE, Nadine PEYRIÉRAS, Marc VASSEUR)

Depuis plusieurs années, les recherches de ce laboratoire ont été centrées sur la première différenciation de l'embryon, la formation du blastocyste. Cela implique l'étude de marqueurs spécifiques de chacun des types cellulaires ainsi qu'un moyen d'interférer réversiblement avec la différenciation.

A. Etude de la régulation de l'expression de *Endo A* et de *B2*

1. Structure génétique de *Endo A*.

La protéine *Endo A*, de 55 kd, est déterminée par un gène $\alpha 1$, de 8 kb de long comportant 8 introns. Les parties codantes totalisent 1,7 kb. La séquence de la partie 5' du gène révèle une structure typique d'un gène eucaryote : présence d'un ATG et d'une phase de lecture ouverte, boîte TATA à 100 pdb en amont de l'ATG, boîte CAT et région riche en GC comportant des séquences symétriques répétées directes ou répétées inverses en amont de la boîte TATA. Le génome comporte également un pseudo-gène, $\alpha 2$, de 1,7 kb de long, dépourvu d'intron. La séquence de l'extrémité 5' de $\alpha 2$ est identique, à 2 nucléotides près, à celle de $\alpha 1$. Cette homologie s'arrête brutalement à 30 pdb en amont de l'ATG. Les séquences deviennent alors complètement différentes et, en particulier, on ne trouve pas de promoteur dans $\alpha 2$. Il est vraisemblable que $\alpha 2$ est une copie réserve, cDNA du mRNA

de la protéine Endo A, réinsérée dans le génome. On ne dispose pas d'informations sur les positions relatives de $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans le génome.

2. Etude fonctionnelle de $\alpha 1$.

a) Caractérisation de l'extrémité 5' du mRNA dans différentes cellules.

On a utilisé la technique de cartographie à la nucléase S1 à l'aide de sondes simples brins pour localiser l'extrémité 5' du mRNA et étudier le niveau de régulation de Endo A dans différents types cellulaires. L'extrémité 5' du mRNA transcrit à partir de $\alpha 1$ est situé à 80 bp en amont de l'ATG et à 20 bp en aval de la boîte TATA. Cette position correspond à la localisation usuelle du site de « capping » des mRNA eucaryotes. L'expression de Endo A est bloquée au niveau transcriptionnel dans les cellules de carcinome embryonnaire telles que F9, PCC3, PSA. Ce blocage est levé lors de l'induction de la différenciation, par exemple lors du traitement de cellules F9 par l'acide rétinoïque. L'initiation (l'extrémité 5') du mRNA est normale dans ces conditions. Dans des cellules fibroblastiques, l'expression de Endo A est également bloquée au niveau transcriptionnel (cellules 3T3, 3T6, etc.).

b) Analyse du promoteur de Endo A.

Pour étudier le rôle des régions promoteur dans la spécificité tissulaire de la régulation transcriptionnelle de Endo A, on a construit des plasmides contenant divers fragments des régions 5' de $\alpha 1$ placés en amont du gène CAT. On a analysé l'expression de CAT dans différentes cellules transfectées par ces plasmides, soit dans des cellules qui expriment normalement Endo A, telles TDM1 ou PYS, soit dans des cellules ne transcrivant pas du tout du mRNA de Endo A. Jusqu'à présent, cette technique n'a pas permis, en dépit d'expériences multiples avec de nombreuses constructions, de mettre en évidence une spécificité tissulaire notable de la région promoteur de $\alpha 1$. Les témoins étaient effectués en utilisant des plasmides contenant les promoteurs du collagène $\alpha 1$, de la β -actine ou de SV40, et ont toujours donné des résultats cohérents compatibles avec ceux rapportés dans la littérature. Donc la région promoteur de $\alpha 1$, soit présente une incompatibilité particulière avec le gène CAT dans un système d'expression transitoire, soit ne possède pas de spécificité tissulaire à elle seule.

c) Analyse chez l'embryon.

L'intérêt d'un marqueur de différenciation précoce tel que Endo A, qui est exprimé dans le trophoctoderme mais pas dans la masse interne, est, entre autre, de permettre d'étudier un gène au niveau de blastomères individuels au cours des stades précédant cette première différenciation. On a

étudié la régulation de la transcription de $\alpha 1$ dans l'embryon précoce, par la technique de la nucléase S1, sur du RNA extrait de cellules du stade 2 cellules, 8 cellules et blastocystes (collaboration avec D. Morello et C. Babinet). Le mRNA de Endo A, avec une extrémité 5' correcte, apparaît au stade 8 cellules. Au stade blastocyste, la quantité de RNA décelé augmente d'un facteur 20 (en rapportant au nombre de cellules utilisées dans les deux cas). Ce résultat vérifie, au niveau de l'embryon précoce, le caractère transcriptionnel de la régulation de Endo A.

3. Etude des séquences B2.

Le gène $\alpha 1$ contient, dans son troisième intron, une séquence répétitive de type B2. Ces séquences peuvent être transcrites sous forme de petits RNA. On a observé une exclusion mutuelle de l'expression des petits RNA B2 et de Endo A. Par exemple : expression de Endo A dans TDM1, dans le foie, dans le rein, mais pas d'expression de B2 dans ces cellules ; expression de B2 dans F9 et les cellules L, mais pas d'expression de Endo A ; pas d'expression, ni de Endo A, ni de B2 dans les fibroblastes.

On a également étudié l'expression de B2 dans l'embryon précoce par hybridation *in situ*. Au stade 1 cellule fécondée, un des deux pronucleus est toujours plus marqué que l'autre et on observe également une expression diffuse de B2 dans le cytoplasme. Au stade 2 cellules, il semble y avoir un arrêt ou du moins un ralentissement de l'expression de B2. Cette expression reprend fortement, dans les noyaux, après la deuxième division (stade 4 cellules). Au stade 8, les noyaux sont toujours fortement marqués. Dans le blastocyste, la MCI est marquée intensément au niveau des noyaux et du cytoplasme ; le trophoctoderme est également marqué mais l'expression de B2 dans ces cellules semble être plus diffuse, moins intense que dans la MCI et semble diminuer au cours de l'expansion du blastocyste. Au jour 7, l'ectoderme et le mésoderme sont marqués ; en revanche, l'endoderme n'exprime pas du tout de B2. Ce résultat confirme, au niveau même de l'embryon, les observations d'une exclusion mutuelle entre les expressions de B2 et de Endo A.

B. *E.Tn*, une famille de rétrovirus endogènes transcrite au cours de l'embryogenèse précoce de la souris.

1. Structure des LTRs et régions avoisinantes.

On a précédemment montré qu'*E.Tn* est une famille de séquences d'ADN de 6 kb, répétées plusieurs centaines de fois dans le génome de la souris. Un plasmide appelé pMAC-2 a été construit. Il contient une séquence génomique complète. Deux répétitions directes, LTRs, sont situées aux extrémités

de cette séquence. Les séquences des nucléotides de ces deux LTRs ont été obtenues. Les LTRs 3' et 5' sont composés de 322 pb et diffèrent par une seule mutation ponctuelle.

Utilisant l'ARN transcrit dans les cellules CE, on a pu montrer par des techniques d'élongation d'amorces spécifiques, de cartographie à la S1 et de séquençages des nucléotides de l'ADNc que les LTRs de la famille E.Tn ont la structure classique U_3RU_5 des rétrovirus. R est une répétition de 12 bases située aux extrémités 5' et 3' de l'ARN transcrit, U_3 est au bout 3', U_5 au bout 5'. Par des analyses d'hétéroduplexes ARN:ADN visualisés en microscopie électronique, nous savons de plus que cet ARN est colinéaire à l'ADN du recombinant génomique pMAC-2.

Une séquence répétée et inversée de 9 pb encadre chaque LTR. De même que dans les LTRs rétroviraux, un signal de polyadénylation et une boîte TATA sont situés dans le domaine U_3 .

Une duplication de 6 pb d'ADN vraisemblablement cellulaire encadre la séquence E.Tn totale. Finalement, à partir de la séquence des nucléotides, des structures secondaires ont été mises en évidence impliquant les extrémités 5' de 2 molécules d'ARN E.Tn et 2 molécules de tRNA 3 Lys. La séquence homologue au tRNA Lys se trouve 2 pb en 3' du LTR 5'. Elle est suivie d'une longue séquence sans phase de lecture ouverte.

2. *Distribution spatiale des transcrits au cours de l'embryogenèse.*

On a analysé la transcription de ces séquences par hybridation ARN:ADN *in situ* sur des coupes d'embryons précoces de souris avec des sondes couvrant soit la séquence E.Tn entière, soit uniquement le LTR. On a pu montrer que la transcription est intense dans la lignée pluripotente de la masse cellulaire interne et de l'ectoderme embryonnaire dans des embryons de 3,5 à 7,5 jours. Dans les stades de préimplantation, l'ARN est décelable à un plus faible niveau. Les tissus différenciés expriment l'ARN à bas niveau sauf l'ectoderme extra embryonnaire dans lequel un haut niveau de transcription est détecté. Des embryons tardifs, après 8,5 jours, ont un niveau uniforme et relativement bas de transcription. Cette étude a été confirmée par une analyse semi-quantitative biochimique de l'ARN dans les embryons tardifs.

C. *Etude de l'uvomoruline*

1. *Structure de la protéine et de ses précurseurs.*

Le premier événement morphogénétique affectant l'embryon de souris, généralement appelé compaction, se produit au stade 8 cellules. Les blasto-

mères de l'embryon, possédant jusqu'alors une forme sphérique, s'aplatissent les uns contre les autres augmentant ainsi les surfaces de contact intercellulaire. Des fragments Fab d'immunoglobulines ou des immunoglobulines dirigées contre des cellules de carcinome embryonnaire (CE) peuvent inhiber la compaction de l'embryon de souris ou rendre à des blastomères compactés une morphologie sphérique. L'uvomoruline (UM), glycoprotéine présente sur des membranes de tumeurs F9, a été décrite comme étant capable d'inhiber l'activité décompactante de ces fragments Fab. L'injection chez le rat d'un fragment de digestion tryptique de l'uvomoruline (UMt) a permis la préparation d'un anticorps monoclonal (DE1) qui reconnaît l'UMt en présence de calcium. Nous avons pu, à l'aide de cet anticorps, étudier l'uvomoruline solubilisée dans des détergents non ioniques. Dans un lysat de détergent de cellules CE marquées par de la méthionine ^{35}S , DE1 immunoprécipite en présence de calcium trois produits majeurs de masses moléculaires 120 000, 100 000 et 88 000. La réalisation de cartes peptidiques a permis de montrer que seul le produit de 120 000 daltons est apparenté au fragment tryptique de l'uvomoruline et peut donc être considéré comme étant l'uvomoruline. Les produits de 100 000 et 88 000 daltons ne sont pas apparentés à l'UMt de même qu'ils ne semblent pas être apparentés entre eux. L'uvomoruline et les produits de 100 000 et 88 000 daltons sont exprimés à la surface de la cellule avec des cinétiques comparables, comme le montrent des expériences de marquage de cellules CE par de la méthionine ^{35}S suivi par une chasse par de la méthionine non marquée. Les expériences faites jusqu'ici ne permettent pas de distinguer entre la présence d'un complexe ou l'existence d'épitopes communs entre les différents produits immunoprécipités par DE1.

Nous avons pu, avec des expériences de fractionnement de lysats de détergent Triton X 114 et des expériences de marquage biosynthétique en présence d'inhibiteurs de glycosylation, décrire certaines étapes de la biosynthèse de l'uvomoruline. A la suite d'un marquage de 10 minutes de cellules CE par de la méthionine ^{35}S , l'uvomoruline est détectée sous la forme d'un précurseur de 135 000 daltons capable de lier des micelles de détergent. Ce produit subirait rapidement un premier clivage protéolytique le privant de ses propriétés amphipatiques et donnant, en gel de polyacrylamide SDS, un produit de mobilité électrophorétique plus faible. Une seconde coupure protéolytique donnerait l'uvomoruline mature hydrophile (120 000 daltons). Cette étape aurait lieu après l'acquisition d'une structure complexe par certains des groupements polysaccharidiques liés à l'asparagine portés par l'uvomoruline.

L'uvomoruline n'est pas uniquement présente au cours de l'embryogenèse précoce, sa distribution chez l'adulte et ses propriétés vis-à-vis du calcium en font un homologue possible de molécules d'adhérence cellulaire dépendantes du calcium décrites dans d'autres espèces. L'étude de la structure de l'uvomoruline, de sa distribution cellulaire et de son devenir au cours du

développement devrait permettre une comparaison précise avec les autres molécules d'adhérence cellulaire décrites et permettre de mieux comprendre leur fonction.

2. Clonage du gène de l'uvomoruline.

Le vecteur lambda gt 11 (lac 5, nin 5, c1857, Sam 100) possède un site unique Eco R1 localisé dans le gène Lac Z, à 53 paires de bases en amont du codon de terminaison de la β -galactosidase. Les phages contenant une insertion produisent une protéine hybride fusionnée à la β -galactosidase qui est alors rendue inactive. Ils peuvent, ainsi, être distingués des phages non recombinants par leur incapacité à produire des plages de lyse bleues sur une bactérie hôte Lac Z⁻ sur un milieu contenant l'indicateur 5-bromo 4-chloro indolyl D galactoside (X gal). Le vecteur lambda gt 11 peut accepter des insertions allant jusqu'à 8,3 kb. Sa capacité à former des lysogènes peut être utilisée pour accroître la production de protéines hybrides à partir des transcrits de l'ADN étranger. Le vecteur produit un répresseur c1857 inactif à 42 °C et porte une mutation « ambre » S 100 qui rend la lyse défective. En conséquence, les bactéries lysogènes peuvent être induites par une augmentation de la température à produire de grandes quantités de phages en absence de lyse.

Deux banques de cADN de carcinome embryonnaire ont été obtenues avec ce vecteur. Le cADN a été préparé par transcription réverse des ARN messagers des cellules PCC4. La première banque (90 000 recombinants représentant 75 % des phages totaux de la banque) a été construite avec 10 ng de cADN total et 500 ng de vecteur. La seconde banque (100 000 recombinants représentant 25 % de la banque) a été construite avec 5 ng d'une fraction de cADN de haut poids moléculaire (fragments de taille supérieure à 1 kb) et 500 ng de vecteur.

L'analyse des clones par l'antisérum préparé contre l'uvomoruline a été réalisée avec la banque de haut poids moléculaire, amplifiée (contenant 20 % de recombinants). Après transfection, les bactéries sont cultivées à 42 °C pendant 4 heures. Les plages de lyse se forment en absence de production de protéines hybrides. Des filtres de nitrocellulose imprégnés d'IPTG sont alors déposés sur les boîtes. La production de protéines hybrides se fait donc au niveau des bactéries non lysées ou en cours de lyse, à la périphérie des plages. Après 3 heures de culture à 37 °C, le dépôt de protéine sur les filtres est suffisant pour pouvoir être détecté par un antisérum spécifique de l'antigène recherché. La révélation par la diaminobenzidine du complexe antigène-anticorps couplé à la peroxidase, dessine les clones positifs en couronne brune.

Quatre clones positifs ont été ainsi isolés à partir d'une population de 30 000 recombinants, avec l'antisérum préparé contre l'uvomoruline. La

préparation de l'ADN de ces clones pour déterminer la taille des insertions, ainsi que la préparation de clones lysogènes pour l'étude de la protéine hybride, sont en cours.

D. Protéines de choc thermique

Au cours des années précédentes, on a établi que l'embryon de souris avant implantation synthétise spontanément de très fortes quantités de certaines protéines de choc thermique (HSP) mais que la synthèse des autres ne peut être induite par un stress. Cette année a été surtout consacrée à l'approfondissement de ces observations. On a étudié l'expression spontanée de la HSP de 89 KDaltons. On a essayé de lier l'impossibilité d'induire la synthèse de la HSP de 68 KDaltons aux diverses transitions morphologiques lors de l'embryogenèse précoce. Enfin, on a recherché l'origine de cette non-inductibilité. Parallèlement à ces travaux, on a entrepris une comparaison de la séquence codée par un gène de segmentation de la *Drosophila* et des antigènes T des papova virus.

1. Expression spontanée des HSP de 89 KD.

La HSP de 89 KD est l'une des trois protéines qui incorpore le plus de méthionine dans l'embryon au stade 8c. On a constaté que cette protéine correspondait en fait à deux polypeptides de migration différente dans des gels de polyacrylamide/SDS très résolutifs. Ces deux polypeptides ont un point isoélectrique et un profil de protéolyse ménagée très semblable. Par traduction *in vitro* des ARNs, nous avons montré que deux mARNs distincts codaient pour ces protéines. Mais surtout la synthèse de l'une des deux protéines est fortement thermoinduite dans les fibroblastes alors que l'autre ne l'est pas ou peu. Cette dernière est spontanément synthétisée, en absence de stress. Cependant, les cellules de CE et celles de l'embryon précoce synthétisent spontanément en abondance les deux protéines. Ce résultat montre clairement qu'une protéine thermoinductible s'exprime fortement pendant les premiers stades de la vie embryonnaire.

2. Dissection de l'inductibilité de la synthèse d'HSP de 68 KD au cours de l'embryogenèse précoce.

L'HSP de 68 KD est la protéine de choc thermique dont l'inductibilité est la plus spectaculaire. C'est une protéine très conservée à travers l'évolution des bactéries aux mammifères. Son inductibilité s'observe chez tous les organismes étudiés, dans tous les tissus à l'exception des embryons très précoces et de certaines cellules des lignées germinales. Nous avons montré, en collaboration avec Charles Babinet du laboratoire de Génétique des mammifères de l'Institut Pasteur, que la thermoinductibilité de la HSP de

68 KD absente de l'embryon de 8 cellules, apparaît progressivement au cours du vieillissement de la morula, et atteint des niveaux normaux chez le blastocyste de 5 jours. Comme l'embryon de 8 cellules est constitué de 8 cellules équivalentes et que le blastocyste comporte deux types cellulaires distincts, nous avons cherché à déterminer si l'inductibilité apparaissait à la fois dans les cellules du trophoblaste et dans les cellules non différenciées de la masse cellulaire interne. L'analyse des marquages métaboliques après séparation des deux types cellulaires montre qu'ils sont tous les deux inductibles.

3. *Origine de la non-inductibilité de la HSP de 68 KD dans les cellules de carcinome embryonnaire.*

Généralement, la thermoinduction de la synthèse des protéines de choc thermique suppose l'activation de la transcription des gènes correspondants. Cependant, on connaît deux systèmes (l'oocyte de Xénope et le réticulocyte de poulet) chez lesquels la thermoinduction suppose l'activation de la traduction d'ARNs messagers préalablement silencieux. Valérie Mezger, dans le cadre de son DEA de Biologie cellulaire et moléculaire, a préparé des ARNs à partir de cellules de carcinome embryonnaire murin témoin et stressé. D'une part, ces ARNs ont été traduits *in vitro* et, d'autre part, nous les avons hybridés avec une sonde (don du D^r R. Morimoto) après électrophorèse et transfert sur nitrocellulose. Ces expériences nous ont permis d'établir que ni les cellules témoin ni les stressées ne possédaient d'ARNs codant pour la HSP de 68 KD dans les lignées non inductibles. Par ailleurs, dans les lignées de carcinome embryonnaire inductibles, la sonde reconnaît un transcrit plus long (600 pdb) que dans des fibroblastes. Ce résultat inattendu ouvre des perspectives de travail pour les mois à venir.

4. *Homologies entre les antigènes T des papova virus et une protéine codée par un gène affectant la segmentation des larves de Drosophile.*

A certains stades de son développement, l'embryon de *Drosophile* est constitué d'une répétition d'unités morphologiques semblables, les segments. Plusieurs équipes ont isolé un certain nombre de mutations qui affectent la segmentation et la différenciation des segments. Trois des gènes définis par de telles mutations ont récemment été clonés et séquencés. L'un de ces gènes, *Fushi Tarazu* (ou *ftz*) semble coder, en deux exons, pour une protéine de 420 amino acides. Nous avons montré que la séquence codée par le premier exon (250 amino acides) présente des homologies statistiquement significatives avec une séquence de 220 amino acides située dans la partie N-terminale des antigènes T des virus polyome ou SV40. Cette homologie suggère une origine commune et surtout une localisation nucléaire pour la protéine *ftz*. En effet, la région de T SV40, dont on a récemment montré

qu'elle conférerait la localisation nucléaire au T, se retrouve très conservée dans le produit du gène ftz.

IV. LES PROTÉINES DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES, MARQUEURS DE SPÉCIFICATION CELLULAIRE

(Vincent LEGAGNEUX, Alain LILIENBAUM, Denise PAULIN)

Dans un tissu adulte, les polypeptides qui forment le réseau de taille intermédiaire du cytosquelette spécifient le type cellulaire : desmine pour le muscle, GFA pour les astrocytes, triplet des sous-unités de neurofilaments pour le neurone, kératines pour les épithéliums, vimentine pour les dérivés mésenchymateux.

La restriction de chaque classe de filaments intermédiaires à un type cellulaire observée chez l'adulte n'est pas la règle dans les systèmes immatures. Au cours de l'embryogenèse, une expression transitoire de la vimentine est observée (1) pendant la migration de cellules d'endoderme pariétal, cellules qui coexpriment leurs filaments spécifiques de kératines, (2) dans les cellules neuroépithéliales, avant d'être remplacée par les neurofilaments spécifiques des neurones. Au cours de la *transformation cellulaire, in vitro*, l'acquisition de l'immortalisation s'accompagne de la synthèse continue de vimentine.

Deux aspects de la régulation de la synthèse de la vimentine ont été étudiés : un système normal utilisant l'embryon de souris de 9 jours, un système tumoral avec remaniement chromosomique, le lymphome de Burkitt.

A. Remplacement de la vimentine par les neurofilaments dans le système nerveux central de l'embryon de souris

Les résultats suivants ont été obtenus :

1) Les trois sous-unités apparaissent simultanément (70 k, 150 k et 210 k). Elles sont restreintes strictement aux structures nerveuses.

2) L'apparition des neurofilaments est un événement très précoce (9 jours) aussi bien dans le système nerveux central que dans le système nerveux périphérique et est concomitant avec l'extension des neurites.

3) Le développement des neurofilaments corrèle extrêmement bien avec le processus de différenciation neurofibrillaire.

4) L'expression des neurofilaments dans le système central et périphérique prend place après les filaments de vimentine. Les deux types coexistent pendant une période courte. La cinétique de remplacement de la vimentine par les neurofilaments varie dans un même embryon entre les différents types

de neurones. La durée de la coexistence des 2 classes de filaments diffère dans le système nerveux central et les différentes parties du système nerveux périphérique.

5. Dans le système nerveux autonome, l'expression des neurofilaments est synchrone avec celle de certains neurotransmetteurs. A 10 jours de l'embryogenèse, la différenciation catéchol aminergique est décelable dans les cellules sympathiques en même temps que la synthèse des neurofilaments.

B. Arrêt de la synthèse de la vimentine dans les lymphocytes de Burkitt

Alors que les lymphocytes normaux possèdent un réseau de vimentine bien développé qui participe avec l'actine à la mobilité des immunoglobulines de surface, la vimentine est absente dans le lymphocyte de Burkitt (les lignées aussi bien que les biopsies primaires).

Dans les lymphomes de Burkitt caractérisés par une prolifération anormale de lymphocytes B, les cellules présentent une translocation réciproque entre le chromosome 8 et l'un des chromosomes 14, 2 ou 22 porteurs des gènes d'immunoglobuline entraînant une activation de l'oncogène c-myc.

L'absence de synthèse de vimentine est-elle liée au réarrangement chromosomique, soit par altération directe du gène, soit par un facteur de régulation qui pourrait être sous le contrôle de c-myc ?

A l'aide d'une sonde cADN vimentine de 750 bases à partir de l'extrémité 3', on a recherché la présence d'ARN messager et analysé la structure du gène. Des résultats préliminaires ont été obtenus. Le défaut de synthèse de la vimentine correspond à l'absence d'ARN messager mesurée par la traduction *in vitro* et par hybridation avec une sonde cADN vimentine. Etant donné que la synthèse de la vimentine peut être réintroduite transitoirement par la 5-azacytidine dans les lymphocytes de Burkitt, le degré de méthylation a été analysé. Deux fragments d'ADN (4 et 6 Kb) portant le gène vimentine ont un taux de méthylation inférieur dans les cellules de Burkitt, comparés au fragment (11 Kb) hybridant avec la même sonde. Le fait qu'aucun des 2 allèles de la vimentine ne fonctionne, alors qu'un seul des 2 chromosomes est modifié, suggère une action en trans.

V. ÉTUDE GÉNÉTIQUE DE LA SOURIS

(Hubert CONDAMINE)

L'étude génétique des chromosomes t de la souris a été poursuivie selon deux directions. D'une part, en collaboration avec François Bonhomme et Pierre Boursot (Université de Montpellier), on a mis en route la caractéri-

sation d'une nouvelle série d'haplotypes t létaux, à partir de chromosomes t récemment extraits de souris sauvages italiennes et bulgares. 9 haplotypes létaux sont en cours de caractérisation. On espère que certains au moins se révéleront porteurs de mutations létales appartenant à des groupes de complémentation non décelés jusqu'à présent. D'ores et déjà, l'un de ces haplotypes se distingue des autres par le taux de recombinaison relativement élevé qu'il autorise dans la région t. La raison de cette différence, si elle venait à être élucidée, devrait fournir des indications sur le mécanisme de la suppression de recombinaison liée aux chromosomes t.

D'autre part, des stocks porteurs à l'état homozygote de chromosomes t partiels obtenus par recombinaison entre chromosomes t de divers groupes classiques de complémentation (t^{w1} , t^{w5} , t^{w32} , t^{w12} *tf*, t^{wPa-1}) et chromosomes 17 « normaux » ont été constitués. Ces stocks sont désormais prêts pour une étude sérologique qui doit permettre de décider si le complexe H-2 dont chaque recombinant est porteur comporte des gènes issus des deux complexes parentaux ou d'un seul. On s'attend qu'une telle étude fournisse des informations sur la manière dont la recombinaison se passe entre chromosomes t et chromosomes des souris de laboratoire.

PUBLICATIONS

Publications 1983

J.V. BARNIER, *Etude de l'expression spontanée ou induite d'une protéine de choc thermique dans les lignées de carcinome embryonnaire et de fibroblastes embryonnaires. Caractérisation d'une association entre cette protéine de 90 Kd et un acide ribonucléique (D.E.A. de Microbiologie, Paris 7, septembre 1983).*

P. BRÛLET, *Sondes moléculaires pour l'étude de la première différenciation dans l'embryon de souris (Bull. Inst. Pasteur, 82, 83-86, 1984).*

P. BRÛLET, *Differential expression of a middle repetitive sequence in the mouse (XIIth U.C.L.A. Symposia on Gene Expression. Journal of Cellular Biochemistry, n° 389, 1983).*

P. BRÛLET, *Early differential tissue expression of transposon-like repetitive DNA sequences of the mouse (Tables Rondes Roussel U.C.L.A.F., « Cellular diversification in the early mouse embryo », Paris, 1983).*

H. CONDAMINE, J.L. GUÉNET et F. JACOB, *Recombination between two mouse t haplotypes (t^{w12} *tf* and t^{Lub-1}) : segregation of lethal factors relative to centromere and tufted (*tf*) locus (Genet. Res., 42, 335-344, 1983).*

B. EDDE, J.F. NICOLAS, M. SIMONNEAU et K. TAKEDA, *Evidence for neuronal differentiation of mouse embryonic carcinoma cells ; a patch clamp study (Physiological Society, Londres, 1983).*

F. JACOB, *Evolution and tinkering (In : « Biological Foundations and Human Nature », M. Balaban éd., Academic Press, New York, 19-42, 1983).*

F. JACOB, *Expression of embryonic characters by malignant cells (In : « Fetal antigens in Cancer », Pitman, Londres, Ciba Foundation, Symposium 96, 4-27, 1983).*

M. MORANGE, *Heat-shock proteins synthesis in early embryogenesis (Tables Rondes Roussel U.C.L.A.F., « Cellular diversification in the early mouse embryo », Paris, 1983).*

N. PEYRIERAS, E. BAUSE, G. LEGLER, R. VASILOV, L. CLAESSON, P. PETERSON et H. PLOEGH, *Effects of the glucosidase inhibitors mojimycin and deoxymojimycin on the biosynthesis of membrane and secretory glycoproteins (The E.M.B.O. Journal, 2, 823-832, 1983).*

Publication 1984

F. ALFONSI, M. DARMON, N. FOREST et D. PAULIN, *Intermediate sized filaments as markers of neuronal differentiation (In : « The role of cell interactions in early neurogenesis ». Plenum Publ. Corporation. A.M. Duprat, A. Kato, M. Weber éd., 77, 157-176, 1984).*

M.H. BUC-CARON et M. DARMON, *Article d'introduction de la différenciation cellulaire animale. Chapitre sur le tératocarcinome murin comme modèle de différenciation (Encyclopedia Universalis, 1984).*

B. BURKE, K. MATLIN, E. BAUSE, G. LEGLER, N. PEYRIERAS et H.L. PLOEGH, *Inhibition of N-linked oligosaccharide processing does not interfere with surface expression of integral membrane proteins (The E.M.B.O. Journal, 3, 551-556, 1984).*

P. COCHARD et D. PAULIN, *Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo (J. Neurosciences, 4, 2080-2094, 1984).*

M. DARMON, J.F. NICOLAS et D. LAMBLIN, *5-Azacytidine is able to induce the conversion of teratocarcinoma-derived mesenchymal cells into epithelial cells (The E.M.B.O. Journal, 3, 961-967, 1984).*

F. JACOB, *Introduction « Emile Roux-Albert Calmette ». Commémoration du 50^e anniversaire de leur disparition (Bull. Inst. Pasteur, 82, 5-6, 1984).*

F. KELLY et O. KELLERMANN, *Introduction de gènes dans l'œuf de souris afin d'étudier leur expression au cours du développement. Recherche fonda-*

mentale en amont des biotechniques (Colloque C.N.R.S.-M.R.T., novembre 1984).

A. LILLENBAUM, *Expression du gène vimentine dans le lymphome de Burkitt* (D.E.A. de biochimie, Paris 7, septembre 1984).

M. MORANGE, A. DIU, O. BENSUADE et C. BABINET, *Altered expression of heat shock proteins in embryonal carcinoma and mouse early embryonic cells* (*Mol. Cell. Biol.*, 4, 730-735, 1984).

D. PAULIN, *Le cytosquelette des cellules nerveuses dans la maladie d'Alzheimer* (Publication I.N.S.E.R.M., 1984).

N. PEYRIÉRAS, *Biosynthèse d'une molécule d'adhérence cellulaire dépendante du calcium : l'uvomoruline* (D.E.A. de Biochimie, Paris 6, septembre 1984).

M. PLA et H. CONDAMINE, *Recombination between two mouse *t* haplotypes (t^{w12} *tf* and t^{Lub-1}); mapping of the *H-2* complex relative to centromere and tufted (*tf*) locus* (*Immunogenetics*, 20, 277-286, 1984).

J.L.R. RUBENSTEIN, J.F. NICOLAS et F. JACOB, *L'ARN non sens (nsARN) : un outil pour inactiver spécifiquement l'expression d'un gène donné in vivo* (*C.R. Acad. Sci. Paris*, 299, 271-274, série III, 1984).

J.L.R. RUBENSTEIN, J.F. NICOLAS et F. JACOB, *Construction of a retrovirus capable of transducing and expressing genes in multipotential embryonic cells* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 7137-7140, 1984).

M. VASSEUR, *Possible role for a repetitive sequence in the regulation of *Endo A** (Symposium Pasteur-Weizmann « Molecular and cellular aspects of embryonic development », Rehovot, 1984).

M. VASSEUR, *Structure of the *Endo A* gene* (U.C.L.A. Symposium « Molecular Biology of Development », Denver, 1984).

M. VASSEUR, P. DUPREY, C. MARLE, P. BRÛLET et F. JACOB, *Isolation and characterization of mouse genomic DNA clones of an early differentiation marker : *Endo A** (U.C.L.A. Symposia on Molecular and Cellular Biology. *Molecular Biology of Development*, New Series, 19, 1984).

Y.S. XU et P. BRÛLET (*Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 17, 291-297, 1984).

Y.S. XU et P. BRÛLET (*Chinese Zoological Research*, 5, 140-145, 1984).