

Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Le cours, cette année, a porté sur certaines applications de la génétique moléculaire à l'étude du développement embryonnaire.

On a discuté tout d'abord de données récentes obtenues chez certains organismes où l'on peut sélectionner aisément des mutants. C'est le cas, par exemple, du Nématode *Caenorhabditis elegans* dont l'étude s'est fortement développée au cours de la dernière décennie. Il s'agit d'un petit organisme de 1 mm, hermaphrodite, facile à cultiver. Il se multiplie sur des boîtes de gélose en se nourrissant de colibacilles. On peut en obtenir jusqu'à 10^5 par boîte de Pétri. A 20 °C, le cycle de vie, d'œuf à œuf, dure environ 65 heures. Les hermaphrodites XX se fécondent eux-mêmes. Chacun produit quelque 300 à 400 descendants. Quelques individus XO se comportent comme des mâles, ce qui permet d'effectuer des croisements. Un hermaphrodite est formé de 959 cellules somatiques. Par observation directe, on a pu établir la filiation cellulaire complète qui conduit du zygote unicellulaire à l'adulte. Le sort de chaque cellule a été précisé par microscopie, optique et électronique. Le développement de l'embryon peut se résumer par un diagramme qui précise chacune des divisions cellulaires et détaille le sort de chacune des cellules produites par ces divisions. Les lignées cellulaires sont strictement invariantes. Chaque individu d'une espèce se développe exactement comme les autres membres de la même espèce. On connaît, pourtant, des mutations qui perturbent ce programme de développement de telle sorte que des cellules différenciées apparaissent en des positions ou à des moments différents de la normale. Il semble donc que dans de telles lignées, les cellules précurseurs et leurs descendants se comportent de façon autonome.

Toutefois, certaines cellules se comportent de manière non autonome. Leur sort est spécifié par interaction cellulaire. C'est ce qui arrive pour des couples de cellules formant ce qu'on appelle un « couple d'équivalence ». Chacune des cellules peut occuper l'une de deux positions possibles où elle adopte une structure différente et joue un rôle différent. Chacune des cellules peut donc exprimer l'un ou l'autre de deux programmes de différenciation. Elles ont des

potentialités équivalentes. D'où le nom de groupe d'équivalence. Certaines mutations, dites *homéotiques*, par analogie avec celles de la Drosophile, entraînent ainsi des transformations spatiales ou temporeles.

On a alors décrit en détail deux de ces mutations dites *lin* (pour *lineages*).

— *lin-12* qui entraîne une transformation spatiale. Il existe deux classes de mutations *lin-12* :

- semi-dominante : *lin-12* (d) ;
- récessive : *lin-12* (o).

Ces deux classes touchent le même groupe de cellules mais de façon opposée. Chez le type sauvage, une des deux cellules devient une cellule vulvaire, l'autre une cellule dite d'« ancrage ». Chez le mutant *lin-12* (d), les deux cellules deviennent vulvaires. Chez l'homozygote *lin-12* (o), au contraire, elles deviennent toutes deux cellules d'ancrage, ce qui peut se résumer dans le tableau suivant :

	Cellule 1	Cellule 2
<i>lin-12</i> (d)	A	A
<i>lin-12</i> ⁺	A (vulvaire)	B (ancrage)
<i>lin-12</i> (o)	B	B

L'interprétation proposée est la suivante. Un niveau élevé du produit du gène *lin-12* donnerait une cellule vulvaire (A). Un niveau bas, une cellule d'ancrage (B). Chez le type sauvage, ce produit serait en quantité élevée dans la cellule 1 et faible dans la cellule 2. Chez le mutant récessif, la formation du produit *lin-12* serait nulle dans les deux cellules qui deviendraient B toutes les deux. La mutation dominante élèverait le niveau du produit dans les deux cellules qui deviendraient toutes deux de type A.

A l'aide d'un mutant thermosensible réversible, il a été possible de préciser la période d'activité du gène *lin-12*. Cette période correspond à celle où le sort des deux cellules se détermine.

En résumé, le gène *lin-12* paraît agir comme une sorte de commutateur effectuant une décision entre deux destins cellulaires possibles et exclusifs chez le type sauvage.

— *lin-14* qui entraîne une transformation temporelle. Pour cette raison, elle est appelée hétérochronique. Les mutations hétérochroniques modifient le moment du développement pendant lequel survient un événement donné. *Lin-*

14 change ainsi le temps où surviennent certaines divisions cellulaires. Comme chez *lin-12*, il existe deux classe de mutations touchant le gène *lin-14*.

- *lin-14* (d) : dominant, retarde ces divisions ;
- *lin-12* (o) : récessif, les avance.

L'explication est semblable à celle proposée pour les mutations *lin-12*. Pour que les divisions surviennent au bon moment, il faut une concentration élevée du produit tôt et basse plus tard. Quand la concentration de ce produit reste élevée, comme chez le mutant dominant, l'événement est retardé. Il est avancé, au contraire, chez le mutant *lin-14* (o) où la formation du produit est abolie.

Ce type de mutation hétérochronique, observée chez le Nématode présente un immense intérêt. C'est, de toute évidence, un modèle important de système régulateur dont le principe doit jouer également chez les organismes supérieurs. C'est également un modèle très utile pour comprendre certains changements évolutifs, comme les modifications dues à la néoténie.

On a ensuite discuté certains aspects du développement de la Drosophile. On s'est attaché à décrire les travaux récents effectués sur les gènes homéotiques. En particulier sur le gène *engrailed*, dont l'analyse moléculaire a été réalisée en détail par plusieurs équipes américaines. On a insisté sur les analogies de séquence et les relations de structures protéiques observées entre produits des gènes homéotiques et certains répresseurs bactériens ou ceux de la levure, notamment dans le système des « types sexuels » (mating types).

A l'aide de sondes correspondant à la « boîte homéotique » des gènes de Drosophile, une série de gènes possédant des séquences semblables ont été isolés chez la Souris et chez l'Homme. Dans les deux cas, on a commencé l'étude de certains de ces gènes. Pour plusieurs d'entre eux, on a pu montrer, dans plusieurs laboratoires, que l'expression de ces gènes est modulée dans le temps et dans l'espace au cours du développement embryonnaire ou lors de la différenciation de cellules en culture. Il est donc probable que, chez les mammifères comme chez les mouches, ces gènes qui possèdent des « boîtes homéotiques » fonctionnent au niveau de l'ADN dans certains systèmes régulateurs.

Cependant la fonction de tels gènes reste parfaitement inconnue. On voit mal comment les modifier par mutation pour en préciser les effets. En revanche, on a montré, aux Etats-Unis comme à l'Institut Pasteur, que l'ARN « antisens » — correspondant à la transcription du brin muet de l'ADN d'un gène — peut inhiber sélectivement l'expression de ce gène. On a décrit en détail les résultats actuels relevant de cette technique nouvelle.

Enfin l'étude de la régulation génétique exige souvent la production de lignées d'animaux dans lesquelles on a artificiellement introduit un gène

choisi. Pour ce faire, on peut notamment utiliser les rétrovirus. On a brièvement discuté certaines techniques qui permettent d'utiliser, dans ce but, des rétrovirus.

F. J.

SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires sur quelques mécanismes moléculaires de l'embryogenèse.

M. Christian SARDET, Directeur de recherche au C.N.R.S., a traité le sujet : Cortex et polarité de l'œuf d'oursin.

M^{me} Isabelle MARTELLY, Maître de Conférence à l'Université Paris XII, a proposé un exposé sur la régénération des planaires.

M. Olivier BENSAUDE, Sous-Directeur de Laboratoire au Collège de France, a fait le point sur l'activation des ovocytes d'oursin et de Souris.

M^{me} Mary WEISS, Directeur de recherche au C.N.R.S., a analysé la régulation de l'expression du gène codant pour l'albumine.

M. Georges CALOTHY, Directeur de recherche au C.N.R.S., a discuté l'effet des oncogènes sur la croissance et la différenciation des cellules nerveuses en culture.

M. Jean-Louis GUÉNET, Chef de Service à l'Institut Pasteur, a fait un séminaire sur la production de mutations chez la Souris.

M^{me} Danièle EVAÏN-BRION, Chargée de recherche à l'I.N.S.E.R.M., a donné un séminaire sur la réceptivité et la sécrétion hormonale au tout début de l'embryogenèse.

M. Klaus SCHERRER, Directeur de recherche au C.N.R.S., a décrit les prosomes : une nouvelle classe de particules cellulaires, impliquées dans la régulation différentielle des gènes.

M. Charles BABINET, Directeur de recherche au C.N.R.S., a présenté quelques applications des Souris transgéniques.

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.

I. TRANSFORMATION DE CELLULES DE CARCINOME EMBRYONNAIRE (CE) PAR UN PLASMIDE HYBRIDE SV40 ADÉNOVIRUS

(Odile KELLERMANN)

Le virus SV40 a des propriétés transformantes et immortalisantes mais ne s'exprime pas dans les cellules de carcinome embryonnaire (CE) ni dans l'embryon avant le 9^e jour. Les adénovirus (type 5 et 12) s'expriment dans les cellules CE. On a construit un plasmide (PK4) qui lie la région précoce de SV40 aux séquences promotrices activatrices de l'unité E1A de l'adénovirus type 5. Des lignées CE transformées ont été obtenues après cotransfection de pK4 avec le plasmide pSV tk neo β et sélection sur G418. Certaines lignées présentent des caractères d'endoderme pariétal. Une autre, en présence d'AMPc, se différencie en neurones catecholaminergiques. D'autres encore donnent des lignées variées de type mésenchymateux.

En collaboration avec F. Kelly et C. Babinet, le plasmide pK4 a été injecté dans un pronucleus d'œufs fécondés. Des Souris transgéniques obtenues sont en cours d'étude.

II. EXPRESSION DES PROTÉINES DE CHOC THERMIQUES (PCT)

(Olivier BENSAUDE, Valérie MEZGER, Michel MORANGE)

La protéine PCT de 90 KD a été résolue en deux éléments distincts, produits par deux ARNs différents. L'une est thermo-inductible, l'autre pas. Les deux sont des composants majeurs de l'embryon précoce. L'interféron potentialise la réponse des fibroblastes de Souris au choc thermique.

III. EXPRESSION ET RÉGULATION DU GÈNE ENDO A AU COURS DE L'EMBRYOGENÈSE PRÉCOCE

(Philippe DUPREY et Marc VASSEUR)

On a étudié l'expression du mRNA de Endo A entre les stades 8-cellules et le jour 7 par hybridation *in situ* en utilisant une sonde spécifique de l'extrémité 5' du gène Endo A. Les signaux observés au niveau du stade 8 sont à la limite de détection mais ne montrent pas de différences entre les blastomères. Au stade blastocyste, le trophoctoderme contient davantage de transcrits Endo A que la masse interne isolée, qui n'est que très faiblement marquée. Au jour 7, l'endoderme est spécifiquement marqué.

On a étudié le fonctionnement du promoteur du gène Endo A en l'associant au gène CAT, et en mesurant l'expression transitoire de ces plasmides

recombinant introduits dans les cellules par transfection. Il n'a pas été possible de trouver une séquence capable de conférer la spécificité tissulaire d'expression, caractéristique du gène *Endo A*, avec des constructions contenant les séquences de - 2 000 à + 2 500 pdb. Une des hypothèses actuellement envisagée est que cette régulation pourrait faire appel à un système de répression qui serait saturé lors des expériences d'expression en transitoire.

IV. ÉTUDE DE LA FAMILLE DE RÉTROVIRUS ENDOGÈNE *E.Tn* (Patrice BLANCHET et Philippe BRÛLET)

L'intérêt de cette structure présente à quelque 200 copies par génome de Souris est d'être transcrite seulement dans les cellules pluripotentes de l'embryon de Souris précoce. La séquence de l'un de ces éléments (6 KB) a été entièrement faite. Les LTR ont la structure classique U_3 RU_5 mais ne correspondent à aucune séquence LTR connue. La séquence ne contient aucune phase de lecture de plus de 200 bases. La comparaison des séquences de plusieurs cDNA montre que plus d'une séquence *E.Tn* est transcrite.

V. ÉTUDE DE SÉQUENCES DE DNA DE SOURIS CONTENANT UNE « HOMÉOBOÏTE » (Philippe BRÛLET et Hervé LE MOUËLLIC)

En utilisant des sondes « homéoboïtes » de *Drosophile*, on a obtenu une vingtaine de recombinants génomiques dans une banque de Souris. L'un de ces gènes a été analysé. La séquence de l'homéoboïte diffère de toutes celles décrites à ce jour chez la Souris. Elle est voisine de celle décrite dans le gène *Antennapedia* de *Drosophile*. La transcription a été étudiée 1) par cartographie avec des RNAses et 2) par hybridation *in situ*. Par cette dernière méthode on observe une transcription dans le feuillet mésodermique de sac vitellin ainsi que dans les cellules endothéliales des vaisseaux segmentaux chez l'embryon, dans l'aorte et dans la notochorde.

VI. ANTIMESSAGERS (Jean-François NICOLAS et John RUBENSTEIN)

Nous avons montré que l'inhibition du gène *LacZ*, en essai transitoire, par des vecteurs exprimant un antimessager est particulièrement efficace. Cette observation a été étendue au gène codant pour la résistance au G418 pour lequel un faible excès du plasmide produisant l'antimessager est suffisant pour produire une inhibition de 90 %. C'est seulement lorsque les vecteurs sens et

antisens sont introduits simultanément dans les cellules par cotransfection qu'une forte inhibition de l'activité β -galactosidase (75 %) est observée après intégration des plasmides.

VII. RÉTROVIRUS RECOMBINANTS : INFECTION ET EXPRESSION DANS LES CELLULES EN CULTURE

(Hedwig JAKOB, Jean-François NICOLAS et John RUBENSTEIN)

Dans les cellules multipotentielles en culture, le gène *neo* ne s'exprime que s'il est mis sous contrôle d'un promoteur interne au rétrovirus. Cependant, les titres des virus recombinants de ce type (MMuLVSvtnéo) restent inférieurs dans les cellules de carcinome embryonnaire à ceux obtenus avec NIH3T3). La partie rétrovirale 5' des rétrovirus recombinants pourrait avoir un effet négatif sur l'expression de SVtnéo. De nouveaux rétrovirus recombinants ont donc été construits (MMuLVSvtnéo Δ Enh) où des délétions ont enlevé les deux « modulateurs » ou LTR 3'. Un des éléments de régulation essentiel du rétrovirus est donc systématiquement éliminé dans le provirus.

VIII. SOURIS TRANSGÉNIQUES OBTENUES PAR INFECTION RÉTROVIRALE

(Jean-François NICOLAS et John RUBENSTEIN)

Des embryons au stade 2-4 cellules ont été cultivés *in vitro* jusqu'au stade blastocyste en présence de cellules transcomplémentantes produisant des rétrovirus recombinants MMuLVnéo. De l'ADN proviral a été retrouvé intégré dans 15 % des fœtus. L'intégration s'était faite par les LTR sans remaniement du génome vital. L'un des fœtus ne montre qu'un seul site d'intégration, le second un site majeur et un site mineur, 10 à 30 % des cellules des embryons contenant le provirus.

IX. MUTAGENÈSE PAR INSERTION

(Hubert CONDAMINE et Jean-Jacques PANTHIER)

Les provirus endogènes MuLV écotropiques sont à l'origine de mutations apparues spontanément chez la Souris. L'utilisation de ces rétrovirus pour faire de la mutagenèse par insertion semble aujourd'hui à la portée de l'expérimentateur. Les Souris hybrides SWR x RF possèdent, intégrés dans leur génome, des provirus MuLV écotropiques qu'on ne trouve dans aucune des lignées parentales. On a donc cherché à développer une méthode permettant l'insertion (ou la réinsertion) de virus exogènes (ou endogènes) dans la lignée germinale de la Souris. Cette méthode constituerait un outil puissant pour obtenir des mutations directement analysables au niveau moléculaire.

X. ÉTUDE DE L'UVOMORULINE

(Laurence MAILLET et Nadine PEYRIÉRAS)

Dans un lysat, par détergent de cellules marquées, l'anticorps monoclonal DE1 précipite trois produits de masse 120 000, 100 000 et 88 000. Les cartes peptidiques montrent que le produit 120 KD est apparenté au fragment tryptique de l'uvomoruline. Les deux autres ne sont apparentés ni à la chaîne 120 KD ni entre eux. En immunoréplique, avec un sérum polyclonal de lapin, seul le produit 120 KD est reconnu par le sérum. On recherche l'existence éventuelle d'un complexe entre les trois chaînes. Des expériences de traduction *in vitro* mettent en évidence deux ARNs peu abondants produisant deux chaînes de 125 et 135 KD respectivement. Par son pI et sa masse moléculaire, la plus lourde correspond au précurseur de l'uvomoruline.

Plusieurs banques de cADN dans les vecteurs d'expression λ gt11 ont été construites à partir de ARN de cellules CE et la présence d'une protéine de fusion β -galactosidase-uvomoruline recherchée avec le sérum polyclonal. Aucun clone n'a été obtenu avec les banques amorcées en 3'. Un clone a été isolé à partir d'une banque à amorce interne. Ce clone contient un fragment de cDNA de 220 paires de base. Il est en cours d'étude.

XI. FORMATION DES PREMIERS ÉPITHÉLIUMS POLARISÉS DE L'EMBRYON DE SOURIS : MISE EN PLACE DE MARQUEURS SPÉCIFIQUES

(Marie-Hélène BUC et Hubert CONDAMINE)

Deux protéines de haut poids moléculaire mises en place très tôt sur les épithéliums polarisés de l'embryon ont été étudiées. Ces molécules très conservées chez les mammifères sont décelées dès le stade morula puis sur une série d'épithéliums polarisés (en particulier, le trophoctoderme, l'endoderme viscéral, l'ectoderme embryonnaire et le neuroépithélium). Dès le stade blastocyste, ces molécules sont organisées à la base des microvillosités, au niveau des puits et des vésicules recouvertes et dans les endodermes. Il s'agit donc de *récepteurs* internalisés par les vésicules à clathrine. Leur fonction est pour l'instant inconnue.

XII. EFFETS DE LA 5-AZACYTIDINE SUR L'EXPRESSION DE GÈNES SILENCIEUX

(Hedwig JAKOB et Jean-François NICOLAS)

La 5-azacytidine provoque une hypométhylation généralisée très tôt après traitement. Les cinétiques de déméthylation de gènes transfectés conduisent à

envisager un mécanisme de reméthylation dans les régions non transcrites après traitement. Par contre, les séquences d'un gène servant de sélecteur des cellules restent fortement déméthylées tant que ce gène est exprimé. Dès que le gène devient silencieux, elles sont fortement méthylées.

XIII. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE VIMENTINE

(Alain LILIENBAUM et Denise PAULIN)

Un clone génomique humain de la vimentine a été caractérisé. Il repère, chez la Souris et l'homme un ARN de 2,2 KB qui code pour la protéine. Un autre ARN de 4 KB s'accumule dans les lymphocytes de Burkitt. Le gène vimentine existe en une seule copie qui est localisée sur le chromosome humain 10. Le bras q24 du chromosome 8 semble impliqué dans la régulation de ce gène.

PUBLICATIONS

Publications 1985

M. VASSEUR, H. CONDAMINE et P. DUPREY, *RNAs containing B2 repeated sequences are transcribed in the early stages of mouse embryogenesis. (The E.M.B.O. Journal, 4, 1749-1753, 1985).*

V. LEGAGNEUX, *Clonage du gène vimentine humain (D.E.A. de Biochimie, Paris 7, septembre 1985).*

P. DUPREY, *Régulation de l'expression des gènes codant pour Endo A dans les cellules de tératocarcinome et lors des premières étapes du développement embryonnaire chez la souris (Thèse de Doctorat 3^e cycle, Paris 7, 18 juin 1985).*

P. BLANCHET, *Etude de l'expression d'une séquence moyennement répétée régulée au cours de l'embryogenèse précoce de la Souris (D.E.A. de Biochimie, Paris 7, septembre 1985).*

M. KAGHAD, L. MAILLET et P. BRÛLET, *Retroviral characteristics of the long terminal repeat of murine E.Tn sequences (The E.M.B.O. Journal, 4, 2911-2915, 1985).*

L. MAILLET et M.H. BUC-CARON, *Modulation of specific protein expression in teratocarcinoma cell aggregates by antibodies affecting cell-cell interactions (Dev. Biol., 111, 1-7, 1985).*

M.C. DARMON et D. PAULIN, *Translational activity of mRNA coding for cytoskeletal brain proteins (J. Neurochemistry, 44, 1672-1677, 1985).*

D. MORELLO, P. DUPREY, A. ISRAEL et C. BABINET, *Asynchronous regulation of mouse H-2D and beta-2 microglobulin RNA transcripts (Immunogenetics, 22, 441-452, 1985).*

M. SIMONNEAU, B. EDDÉ, J.F. NICOLAS et H. JAKOB, *Single channel currents in mouse embryonal multipotential carcinoma cells (Cell Differentiation, 17, 21-28, 1985).*

D. PAULIN, *Les fonctions du cytosquelette (Médecine/Sciences, 4, 198-202, 1985).*

D. PAULIN et J. PERREAU, *Les filaments intermédiaires : une famille multigénique (Ann. Path., 1, 9-20, 1985).*

J.F. NICOLAS et J.L.R. RUBENSTEIN, *Retroviral vectors. In « Vectors : a survey of molecular cloning vectors and their uses » (R.L. Rodriguez éd., Butterworths Publ., 1985).*

O. BENSAUDE, *Homologies between the protein encoded by a Drosophila segmentation gene and the papovavirus large T antigens (Ann. Inst. Pasteur/ Viro., 136 E, 205-212, 1985).*

M. VASSEUR, P. DUPREY et F. JACOB, *One gene and one pseudogene for type cytokeratin endo A (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 82, 1155-1159, 1985).*

P. BRÛLET, H. CONDAMINE et F. JACOB, *Spatial distribution of transcripts of the long repeated ETn sequence during early mouse embryogenesis (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 2054-2058, 1985).*

N. PEYRIERAS, D. LOUWARD et F. JACOB, *Characterization of antigens recognized by monoclonal and polyclonal antibodies directed against uvomorulin (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 8067-8071, 1985).*

P. DUPREY, D. MORELLO, M. VASSEUR, C. BABINET, H. CONDAMINE, P. BRÛLET et F. JACOB, *Expression of the cytokeratin endo A gene during early mouse embryogenesis (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 8535-8539, 1985).*

F. JACOB, *L'évolution. (La Vie des Sciences, C.R. Acad. Sci., 2, n° 5, 405-407, 1985).*

P. BRÛLET, P. DUPREY, M. VASSEUR, M. KAGHAD, D. MORELLO, P. BLANCHET, C. BABINET, H. CONDAMINE et F. JACOB, *Molecular analysis of the first differentiations in the mouse embryo (Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 50, 51-57, 1985).*

J.F. NICOLAS, J.L.R. RUBENSTEIN, C. BONNEROT et F. JACOB, *Introduction of genes into embryonal carcinoma cells and preimplantation embryos by retroviral vectors. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology (Molecular Biology of Development, 50, 713-720, 1985).*

Publications 1986

E. KORDELI, J. CARTAUD, H.O. NGHIEM, L.A. PRADEL, C. DUBREUIL, D. PAULIN et J.P. CHANGEUX, *Evidence for a polarity in the distribution of proteins from the cytoskeleton in Torpedo marmorata electrolytes* (*J. Cell. Biol.*, 102, 748-761, 1986).

H. CONDAMINE, *Outlines of early mouse embryogenesis. Les Houches, Session XLII, 1984. Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie du développement/Cellular and molecular aspects of developmental biology* (M. Fougereau and R. Stora eds. Elsevier Science Publ. B.V., 121-158, 1986).

O. BENSAUDE et M. MORANGE, *L'ubiquitine : les cellules font le ménage* (*La Recherche*, 17, 536-537, 1986).

O. KELLERMANN et F. KELLY, *Immortalization of early embryonic cell derivatives after the transfer of the early region of simian virus 40 into F9 teratocarcinoma cells* (*Differentiation*, 32, 74-81, 1986).

J.L.R. RUBENSTEIN, J.F. NICOLAS et F. JACOB, *Introduction of genes into preimplantation mouse embryos by use of a defective recombinant retrovirus* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 366-368, 1986).