

## Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Le cours, cette année, a porté sur les animaux dits transgéniques, c'est-à-dire les animaux dans le génome desquels a été ajoutée expérimentalement une — ou plusieurs — séquences d'ADN.

Chez les procaryotes, l'analyse des systèmes de régulation des gènes a été possible grâce à l'isolement de mutants dits de régulation et à l'étude de leurs effets. De toute évidence, ce genre d'analyse, encore possible chez le Nématode ou la Drosophile, ne l'est plus chez les mammifères. Pour étudier, chez ces derniers, la régulation de l'expression d'un gène, on est obligé de procéder de la manière suivante : 1) injecter, dans l'œuf fécondé, le gène choisi et les séquences adjacentes d'ADN censées contenir les éléments régulateurs ; 2) récupérer les animaux où le gène ajouté est transmis à la descendance ; 3) analyser l'expression du gène dans le temps et dans l'espace au cours du développement et 4) si cette expression est correcte, re préparer des animaux transgéniques avec des fragments d'ADN amputés de séquences de longueur variable dans les régions régulatrices.

On a ensuite rappelé les résultats obtenus avec la Drosophile. C'est dans ce système, en effet, qu'ont été obtenus les premiers résultats, grâce à la présence d'un vecteur très efficace : le transposon P, qui est impliqué dans les phénomènes de dysgénèse hybride. En insérant dans ce vecteur des gènes déterminant la structure de certains enzymes et en étudiant l'expression de ces gènes chez des animaux transgéniques, on a pu montrer que quelques kilobases de part et d'autre de ces gènes suffisent à assurer l'expression correcte de ces gènes dans le temps et dans l'espace. Cela, indépendamment de la zone d'insertion du gène dans les chromosomes de la Drosophile.

Pour les souris transgéniques, on s'est limité cette année aux animaux obtenus par injection, sans discuter l'utilisation de rétrovirus. On a d'abord décrit en détail les techniques utilisées pour la préparation de l'ADN, l'injection dans l'un des pronucleus, la réimplantation dans des mères nourricières, le repérage des animaux transgéniques, l'utilisation de protéines marqueurs, distinctes de celles produites par le génome receveur, etc. Longtemps, les

résultats obtenus sont restés assez peu encourageants, dans la mesure où les gènes incorporés semblaient soit n'être pas exprimés, soit être exprimés de façon erratique. Jusqu'au moment où Brinster, Palmiter et leurs collaborateurs ont utilisé la région promoteur de la métallothionéine-1 de souris couplée avec différents gènes de structure, notamment celui de l'hormone de croissance de rat ou humaine. En outre, les mêmes auteurs ont montré qu'il était important de se débarrasser, avant injection, des séquences de plasmides, d'*E. coli* utilisés comme vecteurs, ces séquences ayant, pour des raisons inconnues, un effet inhibiteur sur l'expression du gène injecté.

On a ensuite décrit en détail un certain nombre de systèmes où les souris transgéniques fournissent un matériel unique pour l'étude de la régulation génique au cours du développement embryonnaire. Notamment l'alphafœtoprotéine, l'élastase-1, les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I et II, le système immunitaire et les différentes chaînes peptidiques d'immunoglobuline, l'insuline, certains des « oncogènes cellulaires ».

F. J.

#### SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires sur l'étude moléculaire de certains aspects de la différenciation.

M. Claude DESPLAN, Maître de Conférence à l'Ecole Normale Supérieure de Fontenay-aux-Roses, a analysé les fonctions du domaine homéotique « engrailed », gène de segmentation de la *Drosophile*.

M. Michel MORANGE, Professeur à l'Université Paris VI, a fait le point sur l'ubiquitine et son rôle physiologique.

M. André DAUTIGNY, Chargé de recherche au C.N.R.S., a fait un séminaire sur l'étude moléculaire de mutations affectant les protéines majoritaires de la myéline du système nerveux central de souris.

M. Philippe JEANTEUR, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Languedoc, a discuté de la régulation de l'expression de l'oncogène c-myc.

M. Jacques SIGNORET, Professeur à l'U.F.R. des Sciences de Caen, a présenté les DNA-ligases et développement : un modèle pour l'étude expérimentale du contrôle de l'activité d'un gène.

M. Olivier BENSUADE, Sous-Directeur de laboratoire au Collège de France, a proposé un exposé sur l'expression des protéines de choc thermique de 20 à 30 Kd au cours du développement des eucaryotes mono- et pluricellulaires.

M<sup>me</sup> Jacqueline BARRA, Chargée de recherches à l'Institut Pasteur, a discuté de l'implication des génomes paternel et maternel dans le développement de l'embryon de souris.

M. Jean-Claude BOUCAUT, Professeur à l'Université de Paris VI, a présenté des données récentes sur la gastrulation des amphibiens.

M. Bernard MARO, Chargé de recherche au C.N.R.S., a décrit la dynamique du cytosquelette lors du développement précoce de l'embryon de souris.

#### 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. IMMORTALISATION DE CELLULES DE CARCINOME EMBRYONNAIRE (CE) PAR UN PLASMIDE HYBRIDE SV-40 ADÉNOVIRUS

(Marie-Hélène BUC et Odile KELLERMANN)

L'introduction d'oncogènes dans le tératocarcinome a permis pour la première fois l'isolement de cellules souches « immortalisées » correspondant à des cellules embryonnaires précoces, précurseurs des voies mésodermique, neuroectodermique ou endodermique, qui ont gardé la capacité de se différencier *in vitro* et *in vivo*. On a ainsi obtenu un clone *mésoblastique primitif* donnant naissance dans la même tumeur à des zones de fibrosarcome, de liposarcome et de mésothéliome. D'autres clones correspondent à des *cellules souches endodermiques* différenciant *in vivo* et *in vitro* en endoderme pariétal et viscéral, en cellules trophoblastiques, et en cellules d'endoderme intestinal primitif. Enfin un autre clone est un *précurseur neuronal* qui se différencie en neurones cathécholaminergiques exprimant également des enképhalines. Ces cellules ont un phénotype stable. Bien que tumorales, elles ont conservé leur capacité à se différencier selon un programme cohérent.

#### II. RÔLE DES PROTOONCOGÈNES PENDANT LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA SOURIS

(Philippe BRÛLET et Luis PARADA)

Plusieurs oncogènes cellulaires ont un rôle direct dans la multiplication cellulaire. Selon toute vraisemblance, ils jouent un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et de la différenciation. Ils ont le pouvoir « d'immortaliser »

des fibroblastes primaires. Leur rôle dans l'embryogenèse précoce reste difficile à analyser car multiplication et différenciation des cellules sont étroitement imbriquées. On a entrepris d'introduire ces oncogènes immortalisants dans les embryons de souris par l'intermédiaire de cellules embryonnaires précoces CE ou EK. Il sera ainsi possible d'étudier, dans ces cellules, l'expression de ces oncogènes avant de les introduire dans l'embryon.

### III. *E.Tn*, UNE NOUVELLE CLASSE D'ÉLÉMENTS RÉPÉTÉS

(Philippe BRÛLET, Patrice BLANCHET, Yvan LALLEMAND, Hervé LE MOUËLLIC)

On a repéré une séquence de 6 kb présente à raison de quelque 200 copies dans le génome de souris et qui présente la particularité d'être transcrite seulement dans les cellules pluripotentes de l'embryon précoce. La structure de cet élément est inhabituelle. Elle consiste, en effet, en une partie interne, non codante, de plus de 5 kb encadrée de deux longues répétitions terminales ayant toutes les caractéristiques des rétrovirus. On a montré que, au cours de l'évolution, ces éléments doivent évoluer de façon concertée. Pendant le développement précoce de l'embryon, ces éléments sont transcrits avec abondance dans les cellules non différenciées, de la masse cellulaire interne et de l'ectoderme embryonnaire. La régulation de cette transcription est en cours d'étude.

### IV. GÈNES CONTENANT DES SÉQUENCES HOMÉO CHEZ LA SOURIS

(Philippe BRÛLET, Patrice BLANCHET, Yvan LALLEMAND, Hervé LE MOUËLLIC)

Le processus de segmentation chez la *Drosophile* est sous la dépendance des gènes homéotiques et de segmentation. Plusieurs de ces gènes contiennent une petite séquence dite « homéoboîte » très bien conservée de l'insecte aux mammifères, souris et homme. Plusieurs cDNAs complets ont été isolés à partir des banques préparées chez l'embryon de souris. Par hybridation *in situ* sur coupes minces d'embryons, on constate que la transcription de ces gènes ne se fait que dans certains tissus. On cherche à établir la fonction de ces gènes au cours du développement embryonnaire. Pour cela, on prépare des anticorps monoclonaux, spécifiques des protéines correspondantes. En outre, on prépare une série de molécules de DNA recombinant pour obtenir la synthèse de ces protéines *in vivo* dans certaines cellules. Ces molécules recombinantes seront microinjectées dans le pronucleus d'œufs fécondés pour analyser les effets des protéines au cours de l'embryogenèse des animaux transgéniques.

## V. UTILISATION DE RÉTROVIRUS RECOMBINANTS POUR L'EXPRESSION DE GÈNES DANS LES CELLULES MULTIPOTENTIELLES

(Claire BONNEROT, Hedwig JAKOB, Etienne JOLY, Jean-François NICOLAS et Muriel VERNET)

Il est possible d'utiliser les rétrovirus pour introduire des gènes par infection dans les cellules embryonnaires et dans la lignée germinale de la souris. Plusieurs modifications ont pu être introduites dans les rétrovirus recombinants qui ont élargi leur domaine d'utilisation : adjonction de promoteur interne et délétion de certaines régions régulatrices du LTR. Ces deux modifications permettent d'obtenir l'expression contrôlée d'un gène dans le rétrovirus (conservation de la spécificité tissulaire par exemple). Cependant, il reste difficile d'obtenir des populations entières de cellules infectées et exprimant le gène. C'est pourquoi on utilise deux voies complémentaires : 1) construction de nouveaux rétrovirus dont certains ont un mécanisme d'intégration qui s'accompagne de la disparition des deux LTR, libérant totalement le gène introduit des éléments de régulation du virus ; 2) isolement de segment du génome cellulaire permettant l'expression de gènes sous contrôle d'un LTR viral sans séquence activatrice ni promoteur.

## VI. UTILISATION DE RÉTROVIRUS RECOMBINANTS DANS L'ANALYSE DES LIGNAGES CELLULAIRES

(Jean-François NICOLAS et John RUBENSTEIN)

Puisque les rétrovirus recombinants peuvent infecter des cellules et être transmis à leur descendance, ils peuvent fonctionner comme marqueurs pour identifier des clones de cellules dans l'animal. On a développé une approche générale basée sur la détection histochemique de marqueurs LacZ dans des cellules infectées et par un rétrovirus recombinant LacZ défectif. Le recombinant est produit dans certaines cellules qui donnent des stocks de virus non contaminé par du virus sauvage. Ainsi, toute propagation du virus LacZ après l'infection initiale est évitée. Par ce moyen, il est possible à partir du jour 7 de suivre des lignages cellulaires dans les embryons implantés. L'existence de cellules multipotentielles dans le sac vitellin et la peau a été décelée jusqu'aux jours 7 et 9 du développement. Après cela, les cellules subissent une restriction de leurs potentialités. Le virus utilisé (MMuLVSVLacZ) peut servir à l'analyse du lignage des cellules de différents tissus, tâche préalable à toute analyse moléculaire des facteurs impliqués dans leur différenciation.

## VII. ÉTUDE DE L'UVOMORULINE GLYCOPROTÉINE IMPLIQUÉE DANS L'INTERACTION DES CELLULES EMBRYONNAIRES PRÉ-COCES

(François JACOB et Nadine PEYRIERAS)

L'uvomoruline est présente à la surface des cellules CE sous la forme d'une glycoprotéine de 120 000 daltons. Dans tous les types cellulaires étudiés, différenciés ou non, l'uvomoruline est immunoprécipitée avec deux autres protéines de 100 000 et 88 000 daltons. Ces deux produits ne semblent pas être apparentés à l'uvomoruline d'après des analyses de cartes peptidiques. L'hypothèse de l'existence d'épitopes communs à l'uvomoruline et aux protéines de 100 000 et 88 000 daltons est actuellement retenue. L'expression de l'uvomoruline n'est pas restreinte à l'embryon précoce. On la retrouve au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte dans différents organes tels que le poumon, le foie, le rein, mais non le cerveau. Les propriétés biochimiques de l'uvomoruline et sa distribution ont permis de la désigner comme l'homologue de molécules d'adhérence cellulaire décrites dans d'autres espèces, la L-CAM chez le poulet par exemple. La biosynthèse de l'uvomoruline a été étudiée *in vitro* et *in vivo*. Lors de marquages biosynthétiques, l'uvomoruline est décelée sous la forme d'un précurseur de 135 000 daltons. La maturation de l'uvomoruline implique sans doute deux clivages protéolytiques et des modifications de groupements polysaccharidiques liés à l'asparagine. La nature des groupements polysaccharidiques portés par l'uvomoruline a été étudiée grâce à des inhibiteurs de glycosylation (tunicamycine, nojirimycine).

## VIII. LA VIMENTINE, UN FILAMENT INTERMÉDIAIRE DONT LA SYNTHÈSE EST RÉGLÉE PAR LES CONTACTS CELLULAIRES

(Alain LILIENBAUM et Denise PAULIN)

La vimentine appartient à la famille des filaments intermédiaires. Sa synthèse semble liée à l'organisation des contacts cellulaires. Un clone génomique humain a été isolé par hybridation avec un fragment du gène vimentine de poulet. Une séquence partielle a permis d'identifier une région fortement homologue aux exons II à IX (environ 70 à 80 % des séquences codantes), ainsi qu'une région non codante située en aval du gène. La séquence complète du clone est actuellement en cours de réalisation. Un RNA messager unique d'environ 2 kb a été identifié dans les cellules de souris et dans les cellules humaines. Ce messager, abondant dans les fibroblastes, est également présent en quantité importante dans les lymphocytes B en culture, mais n'est pas décelable dans les différents lymphomes de Burkitt étudiés. L'absence de vimentine a aussi été observée dans les cellules issues de patients porteurs du

syndrome de Langer Giedon. Dans ce cas, comme dans le lymphome de Burkitt, la partie q24 du chromosome 8 est altéré. La vimentine ayant été localisée sur le chromosome 10, une étude du rôle du chromosome 8 dans les hybrides cellulaires homme-souris est en cours. Un RNA messenger codant pour la vimentine a été mis en évidence par hybridation avec la sonde humaine uniquement dans les hybrides Sp2 (souris) X lymphocytes (humains) qui contiennent les chromosomes 8 et 10.

### *IX. CLONAGE DU GÈNE GOUVERNANT LA SYNTHÈSE DE LA PROTÉINE ASSOCIÉE AU LUPUS (LAMP)*

(François JACOB et Nadine PEYRIERAS)

Une banque de 100 000 recombinants dans le vecteur d'expression lambda gt11 a été obtenue par transcription reverse de RNA messagers de cellules de carcinome embryonnaire. 120 000 recombinants de la banque amplifiée ont été soumis à repérage immunologique à l'aide d'un antisérum obtenu contre la protéine membranaire LAMP. Un clone réagissait avec le sérum anti-LAMP. La protéine hybride produite par ce clone a un poids moléculaire de 143 kd dont 115 kd appartiennent à la beta-galactosidase ; le cDNA porté par ce clone code donc pour une protéine de 28 kd, reconnue par le sérum anti-LAMP. Un antisérum a été obtenu par immunisation d'un lapin avec la protéine hybride purifiée. Ce nouveau sérum est analysé pour sa réactivité à l'égard de la protéine LAP portée par les cellules PCC4. On a commencé l'étude du fragment de cDNA (1 kb) inséré dans le phage.

### *X. RECHERCHE DE MUTATION INTERROMPANT LE DÉVELOPPEMENT DE L'EMBRYON*

(Hubert CONDAMINE et Jean-Jacques PANTHIER)

La recherche de mutations perturbant le développement embryonnaire est poursuivie dans deux directions. D'une part, on utilise les propriétés que présentent les descendants d'un croisement entre individus de deux lignées de souris consanguines dont l'une (souche RF) apporte dans son génome trois copies d'un provirus de la leucémie murine (MuLV). L'autre souche (SWR) est dépourvue de séquences provirales. Lorsque, à partir des hybrides de première génération, on pratique des rétrocroisements avec le parent SWR au long de deux générations successives au moins, on obtient des descendants chez lesquels de nouvelles séquences provirales sont insérées en des endroits apparemment quelconques du génome. Le site de production de ces particules et la chronologie de l'infection sont explorés par des expériences de transplant d'ovaires et d'embryons très précoce.

On recherche les insertions nouvelles qui ne seraient pas viables à l'état homozygote parce qu'elles entraîneraient la mort de l'embryon à un stade quelconque du développement. On espère repérer ainsi des gènes importants pour le déroulement normal de l'embryogenèse et qui devraient pouvoir être clonés grâce à la sonde d'accès que constituerait la séquence rétrovirale. D'autre part, de nouvelles mutations létales pour l'embryon, trouvées sur des chromosomes et récemment extraits de souris sauvages d'origine italienne, sont en cours de caractérisation. On s'attache en particulier à l'étude d'une mutation qui bloque la différenciation du blastocyste.

#### PRINCIPALES PUBLICATIONS

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).

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 (Molecular Biology of Development, 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).*

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

F. KELLY, O. KELLERMANN, F. MECHALI et C. BABINET, *Expression of Simian virus 40 oncogenes in F9 embryonal carcinoma cells in transgenic mice and in transgenic embryos. Cold Spring Harbor Symp. of DNA tumor viruses (DNA Tumor Viruses Control of Gene Expression and Replication) (Cancer Cells, 4, 1986).*

J.R. SANES, J.L.R. RUBENSTEIN et J.F. NICOLAS, *Uses of recombinant retrovirus to study postimplantation cell lineage in mouse embryos* (*The E.M.B.O. Journal, 5, 2809-2814, 1986).*

A. LILIENBAUM, V. LEGAGNEUX, M.M. PORTIER, K. DELLAGI et D. PAULIN, *Vimentin gene : expression in human lymphocytes and in Burkitt's lymphoma cells* (*The E.M.B.O. Journal, 5, 3133-3142, 1986).*