

Génétique cellulaire

M. François JACOB, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Cette année, le cours n'a pas eu lieu. Le séminaire a porté sur les études moléculaires de la gamétogenèse et de l'embryogenèse précoce.

M. André PICARD, Chargé de recherches au C.N.R.S., a fait un séminaire sur le rôle des centrosomes et du contenu de la vésicule germinative dans le cycle cellulaire au cours de l'embryogenèse précoce chez l'étoile de mer.

M. René OZON, Professeur à l'Université Paris VI, a discuté du rôle de la phosphorylation des protéines dans le mécanisme de la rupture de l'enveloppe nucléaire de l'ovocyte de Xénope.

M. Jean-Jacques TOULME, Directeur de recherche à l'I.N.S.E.R.M., a présenté « la régulation de l'expression génétique par les antimessagers : I - Mécanismes de l'inhibition de la traduction par les ARNs et ADNs antimessagers ».

M. Bernard LEBLEU, Professeur à l'Université Sciences et Techniques du Languedoc, a présenté « la régulation de l'expression génétique par les antimessagers : II - Expression des antimessagers dans les cellules ».

M^{me} Christine POURCEL, Chargée de recherches à l'Institut Pasteur, a fait le point sur l'inhibition maternelle de l'expression du gène HBs (antigène de surface du virus de l'hépatite B) dans une lignée de souris transgéniques.

M. Roger OLLO, Chargé de recherche à l'Institut Pasteur, a fait un séminaire sur : « Krüppel, un gène clé dans l'établissement de la segmentation chez la Drosophile ? Quelle en est la fonction et qui dirige cette « main » ?

M. Jean-Claude BEETSCHEN, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, a décrit l'ovocyte en cours de maturation : un nouveau modèle d'étude de la polarisation dorso-ventrale (croissant gris) chez les amphibiens.

M. Marc HAENLIN, Chargé de recherche au C.N.R.S., a discuté de la polarité dorso-ventrale chez l'embryon de Drosophile : étude du gène fs(1)K10.

M. Jean WEISSENBACH, Directeur de recherches au C.N.R.S., a proposé un exposé sur les échanges normaux et anormaux entre les chromosomes X et Y humains.

M. Philip AVNER, Directeur de recherches au C.N.R.S., a fait le point sur le chromosome X murin : organisation et homologies avec le chromosome X humain.

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Au cours de l'année écoulée, l'étude de la différenciation 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.

ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE DE L'EMBRYON DE SOURIS

I. IMMORTALISATION DE PRÉCURSEURS DES DIFFÉRENTS LIGNAGES CELLULAIRES DE L'EMBRYON DE SOURIS

(Marie-Hélène BUC et Odile KELLERMANN)

On a introduit, dans les lignées de carcinomes embryonnaires F9 et 1003, des gènes immortalisant de SV40 placés sous le contrôle du promoteur E1a de l'adénovirus 5. On a alors isolé des clones immortalisés ayant les caractères de cellules précurseurs de chacun des principaux lignages cellulaires de l'embryon. On a ainsi obtenu : 1) un clone précurseur neuroectoblastique capable d'exprimer plusieurs phénotypes en fonction des conditions de culture. En présence d'acide rétinoïque, les cellules sont de type épithélial et sont marquées par des anticorps anti-leu- et met- enképhaline. En présence d'AMP cyclique, plus de 90 % des cellules développent des extensions bipolaires, co-expriment les protéines d'adhérence N-CAM et L-CAM et la fibronectine, ainsi que des marqueurs de neurones mono-aminergiques ; 2) un clone orienté vers la voie mésoblastique qui induit des tumeurs sarcomateuses contenant des cellules de mésoblaste primitif associées à des fibroblastes, des adipoblastes et des adipocytes ainsi que des cellules mésothéliales. Un autre clone mésoblastique est capable de se différencier en ostéoblastes *in vitro* et *in vivo* et synthétise une phosphatase alcaline spécifique de l'os, sensible à la vitamine D ; 3) d'autres clones correspondant à des précurseurs endodermiques multi-

potentiels qui se différencient *in vitro* et *in vivo* en cellules endodermiques extra-embryonnaires (endoderme pariétal et viscéral) et embryonnaires (intestin embryonnaire), capables d'exprimer la villine, protéine de structure des microvillosités intestinales, lorsque l'on modifie la source de carbone dans le milieu de culture. Tous ces clones immortalisés conservent un phénotype stable en culture ; ils expriment l'antigène T de SV40 et ont gardé la capacité de se différencier *in vitro* et/ou *in vivo*.

II. ÉTUDE FONCTIONNELLE D'UN HOMÉOGÈNE (HOX 3.1) PAR CRÉATION DE SOURIS CHIMÉRIQUES

(Philippe BRÛLET, Patrice BLANCHET, François CONQUET, Hervé LE MOUËLLIC)

Au cours de l'embryogenèse, les cellules doivent intégrer une information de position, phénomène sur lequel peu de choses sont connues chez les vertébrés. Or de nos expériences par hybridation *in situ* sur coupes histologiques, il ressort que l'homéogène Hox 3.1 joue un rôle important dans les premières étapes de la régionalisation de l'embryon de souris. Ces recherches tendent à établir la fonction exacte de ce gène au cours du développement. Au niveau moléculaire, on cherche à caractériser l'unité de transcription et à définir le promoteur ainsi que le mode d'action de la protéine. Une analyse fonctionnelle du rôle de Hox 3.1 au cours du développement est faite en perturbant son activité par surexpression ou inhibition au niveau du DNA, du RNA ou de la protéine. L'approche expérimentale est basée sur la production d'animaux transgéniques (par injection de DNA dans l'œuf) ou chimériques (par injection dans le blastocyste de cellules souches embryonnaires ES, transfection *in vitro*). Plus particulièrement, on développe une nouvelle technologie permettant d'obtenir des souris mutantes pour un gène donné. Cette technologie est basée sur l'obtention de mutations par recombinaisons homologues dans les cellules ES totipotentes. Cette méthode pourra être généralisée à tout gène défini au niveau moléculaire.

III. EXPRESSION D'ONCOGÈNES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

(Philippe BRÛLET, Yvan LALLEMAND et Luis PARADA)

On a cherché à développer l'expression de certains oncogènes au cours du développement de l'embryon en prenant d'abord comme modèle l'oncogène N-myc. Pour cela, on a mis au point une technique nouvelle d'hybridation *in situ* en paraffine. Cette méthode permet une meilleure résolution autoradiographique et surtout une meilleure histologie. On a ainsi constaté que N-myc

apparaît d'abord dans une série de tissus : rétine en formation, somites, myotomes, ganglions et trachée. Il semble que N-myc représente un marqueur du tissu neural précoce. On poursuit maintenant l'étude sur les stades plus avancés du développement avant d'étudier les autres oncogènes. D'autre part, on a commencé à transférer des cellules EK avec des oncogènes insérés sur des virus Moloney défectifs. Avec ces cellules transformées, il sera possible de produire des souris chimères pour y étudier les effets des gènes N-myc ectopiques sur le développement.

IV. LOCALISATION DE L'ACTIVITÉ β -GALACTOSIDASE DANS LE NOYAU DE LA CELLULE

(Jean-François NICOLAS et Claire BONNEROT)

L'utilisation du gène LacZ en tant que marqueur cellulaire ou rapporteur de l'activité transcriptionnelle a été élargie en utilisant une protéine β -gal fusionnée au peptide de localisation nucléaire de SV40 (amino acide 127 à 147 de l'antigène T). La protéine fusionnée conserve l'activité enzymatique qui se trouve alors exclusivement associée à l'enveloppe nucléaire. Aucune activité enzymatique n'est décelable dans le cytoplasme sauf durant la mitose. La localisation nucléaire de la β -galactosidase a été obtenue dans de nombreux types cellulaires dont les myoblastes/myotubes, les cellules multipotentielles et les tout premiers stades de l'embryon de la souris. Les cellules de diverses espèces (hommes, souris, lapins, ovins) utilisent le signal introduit. Ce marqueur est aussi décelable en microscopie électronique. Il semble exclusivement associé aux pores nucléaires. Cette observation pose le problème de savoir si le peptide de localisation nucléaire est suffisant pour transloquer les protéines vers le nucléoplasme.

V. ÉTUDE DE LA SPÉCIFICITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DURANT LES TOUT PREMIERS STADES DU DÉVELOPPEMENT

(Jean-François NICOLAS, Claire BONNEROT, Edith LEGOUY et Muriel VERNET)

Le gène déterminant la structure de la β -gal nucléaire a servi de « rapporteur » de l'activité transcriptionnelle de promoteurs variés, après microinjection dans l'œuf fertilisé. Aucun promoteur ne semble pouvoir être utilisé par l'œuf au stade 1 cellule. En revanche, dès le stade 2 cellules, le promoteur de SV40 et du virus de Rous sont très actifs ainsi que les promoteurs à expression ubiquitaire (HPRT, HMG, β -actine). Au contraire, les promoteurs présentant une expression restreinte à certains tissus (promoteur du gène de

l'interleukine-2 et de la chaîne alpha du récepteur de l'acétylcholine) ne sont pas utilisés. Le promoteur H-2 K^d lui est exprimé, ce qui constitue une exception qui demande explication. L'absence d'expression du LTR du virus de Moloney indique que l'expression de ce virus doit être strictement réglée pendant le développement de l'embryon pour éviter de surcharger en provirus le futur individu. Une étude de promoteurs hybrides entre le LTR de MSV et les 21 bp de SV40 permet de conclure que l'inactivité du LTR de Moloney au début du développement n'est pas due à la présence d'un répresseur mais plutôt à l'absence d'activateur spécifique.

VI. TRI DES CELLULES EXPRIMANT LA β -GALACTOSIDASE A L'AIDE D'UN SUBSTRAT FLUORESCENT

(Jean-François NICOLAS et Gary NOLAN)

La sélection de lignées transcomplémentantes, l'examen de certains problèmes de variation de l'expression génétique et l'analyse quantitative de l'expression des constructions LacZ pourraient être abordés si une méthode de marquage *in vivo* des cellules β -gal⁺ pouvait être mise au point. Pour ce faire, on a utilisé comme substrat la fluorescéine-digalactoside. Dans des conditions particulières de température, on peut marquer les cellules sans que le produit de réaction, la fluorescéine, ne diffuse hors des cellules. Les conditions où la quantité de fluorescéine est proportionnelle à l'activité enzymatique ont ainsi été caractérisées. A l'aide du FACS, le tri des cellules β -gal⁺, à partir de mélanges, a pu être réalisé.

VII. MISE AU POINT D'UN TEST DE DÉTECTION DE COMPOSÉS ACTIFS CONTRE LES RÉTROVIRUS

(Jean-François NICOLAS et Claire BONNEROT)

Les rétrovirus murins et de primates présentent de nombreuses analogies dans leur cycle viral : fixation sur une membrane cellulaire, reverse transcription et passage sous forme provirale. L'utilisation de virus du SIDA pour des tests de dépistage à large échelle de drogues actives soulève des difficultés de quantification (mesure indirecte par l'activité réserve transcriptase) et de lourdeur des tests. On a donc utilisé des rétrovirus recombinants défectifs qui peuvent être suivis par l'expression du gène LacZ. Dans une série d'analyses préliminaires, nous avons montré que ce test permettait de déceler l'activité de l'AZT et de rapidement décrire (en paramètres cinétiques), l'étape où elle intervient dans le cycle viral. Ce test peut donc être utilisé pour déceler l'activité d'autres dérivés de l'AZT ou d'autres drogues.

VIII. CLONAGE, ORGANISATION ET EXPRESSION DES GÈNES CODANT POUR LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

(Denise PAULIN et Alain LILIENBAUM)

Les composants des réseaux de filaments intermédiaires, responsables de l'organisation cytoplasmique, diffèrent avec le type cellulaire. Les polypeptides qui les constituent sont spécifiques des tissus : neurofilaments dans les neurones, GFA dans les astrocytes, desmine dans les muscles et diverses cytokératines dans les épithélium. Dans les cellules précurseurs — neuroblastes, myoblastes, etc. — les filaments sont constitués du même homopolymère : la vimentine. Lors de la transition vers la cellule spécialisée, les filaments de vimentine sont remplacés par ceux de desmine dans le muscle ou par les neurofilaments dans les neurones ou la GFA dans les astrocytes. En vue d'étudier cette transition, les gènes qui codent pour la vimentine, la desmine et les neurofilaments ont été isolés. Le gène vimentine humain a été cloné et sa séquence nucléotidique déterminée. Les séquences régulatrices ont été caractérisées à l'aide d'oligonucléotides synthétiques complémentaires. L'expression de la vimentine est réglée au niveau transcriptionnel ; dans les cellules de mammifères, un seul RNA messenger de 2 000 nt, très stable, a été caractérisé. Le gène est activé dans les lymphocytes par les produits de certains gènes viraux : HTLV1 dans les lymphocytes T et EBV dans les lymphocytes B. Au contraire, dans les cellules où le taux du produit du gène *myc* est élevé, la synthèse du RNA vimentine est inhibée. Le gène de la desmine a été isolé et sa régulation étudiée lors de la transition myoblastes-myotubes. Un RNA messenger de 2 200 nt caractéristique du muscle strié a été identifié. Un second RNA messenger codant aussi pour la desmine est synthétisé dans les cellules musculaires lisses. La recherche d'anticorps est effectuée sur des sérums de patients qui développent une maladie virale. L'hypothèse de ce travail repose sur le fait que le virus détruit un certain type cellulaire. La lyse libère les filaments cytoplasmiques qui sont totalement insolubles et provoquent la synthèse d'auto-anticorps dirigés contre le type de polypeptide spécifique du tissu lésé.

IX. EXPRESSION DES PROTÉINES DE CHOC THERMIQUE DANS LES CELLULES DE L'EMBRYON DE SOURIS PRÉIMPLANTATION

(Olivier BENSUADE, Michel MORANGE et Valérie MEZGER)

Les protéines de choc thermique (HSP) sont des protéines très conservées à travers l'évolution et impliquées dans de nombreux processus fondamentaux du métabolisme cellulaire. On a montré que la protéine de choc thermique HSP 89 pouvait être résolue par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en deux espèces polypeptidiques de migrations différentes. Ces deux espèces

voisines ne semblent pas dériver l'une de l'autre, mais sont codées par deux mARNs distincts soumis à une régulation de transcription différente. L'un est nettement thermoinductible, l'autre pas. Les deux protéines correspondantes (en particulier celle qui est thermoinductible dans les fibroblastes) sont très abondantes dans les cellules de carcinome embryonnaire et dans l'embryon précoce de souris. Généralement, l'expression après choc thermique des gènes codant pour la HSP 68 provient d'une activation spécifique de la transcription de ces gènes et d'une stabilisation des ARNs messagers correspondants. La synthèse de cette protéine n'est observée ni dans l'embryon de souris au jour 3, ni dans certaines lignées de carcinome embryonnaire. On a montré par des expériences de transfection et de transcription *in vitro* (« run-on ») que dans ces lignées de carcinome embryonnaire, la transcription des gènes HSP 68 n'est pas stimulée.

X. ÉTUDE DES ANTIGÈNES IMPLIQUÉS DANS LE LUPUS ÉRYTHÉMATEUX

(François JACOB et Nadine PEYRIERAS)

Le lupus érythémateux disséminé (LED) peut être étudié chez la souris grâce à certaines souches telles que MRL Ipr/Ipr qui développent les caractéristiques de la maladie. La présence dans la circulation sanguine d'auto-anticorps interagissant avec le DNA constitue un des critères du LED. Ces anticorps sont un outil permettant une approche cellulaire et moléculaire des mécanismes de la maladie. La préparation d'hybridomes à partir de souris lupiques permet l'isolement de cellules productrices d'anticorps monoclonaux anti-DNA. La caractérisation de ces anticorps et de leurs multiples réactions croisées a permis l'hypothèse de l'existence d'immunogènes autres que le DNA. En particulier, l'interaction des anticorps anti-DNA avec la surface de certains types cellulaires (IW32, 3T3...) permet d'envisager le rôle de protéines membranaires dans l'évolution de la maladie. L'étude des caractéristiques biochimiques et de la distribution d'une série de protéines de masses moléculaires s'échelonnant entre 10 K et 50 K identifiées grâce aux techniques de détection immunologiques pourrait permettre de progresser dans la compréhension du LED.

XI. RECHERCHES SUR UN SYSTÈME DE MUTAGENÈSE INSERTIONNELLE ENDOGÈNE CHEZ LA SOURIS

(Hubert CONDAMINE et Jean-Jacques PANTHIER)

Les souris de la lignée RF/J portent 3 provirus MuLV écotropiques dans leur génome alors que celles de la lignée SWR/J n'en ont aucun. Chez les

descendants de certaines femelles hybrides SWR × RF obtenues par rétrocroisements répétés avec la souche SWR/J, on observe l'amplification des provirus MuLV. On a examiné l'expression du génome proviral dans le tractus génital de ces femelles par hybridation *in situ*. Le RNA viral est fortement transcrit dans les cellules de la thèque des follicules ovariens moyennement ou pleinement développés. Cette transcription semble mener à la production de particules virales, dont la caractérisation en microscopie électronique est en cours (collaboration avec P. Gounon). Ainsi l'amplification de séquences provirales semble résulter d'une infection des oocytes par des particules produites dans leur environnement. On a tenté de reproduire ce phénomène en infectant des souriceaux SWR/J nouveau-nés par un virus MuLV écotrope originaire d'hybrides SWR × RF, et produit *in vitro* par des cellules SWR/J. Parvenues à l'âge adulte, les femelles SWR/J infectées à la naissance s'avèrent être virémiques et elles présentent le même type de transcription virale dans les cellules thécales des follicules ovariens que les hybrides SWR × RF. En outre, 10 % environ de leurs descendants ont dans leur génome des provirus MuLV, y compris dans les cellules germinales. On reproduit donc complètement, par infection exogène, le processus d'amplification endogène chez les hybrides.

PRINCIPALES PUBLICATIONS

P. SONIGO, S. WAIN-HOBSON, L. BOUGUELERET, P. TIOLLAIS, F. JACOB et P. BRÛLET, *Nucleotide sequence and evolution of ETn elements (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 3768-3771, 1987).*

F. JACOB, *Pasteur et Pastoriens : un certain style en science (La Vie des Sciences, C.R.Acad. Sci. série générale, 4, 437-447, 1987).*

K. DELLAGI, M. LIPINDKI, D. PAULIN, M.M. PORTIER, G.M. LENOIR et J.C.B. ROUET, *Characterization of intermediate filaments expressed by Ewing tumor cell lines (Cancer Res., 47, 1170-1173, 1987).*

L. MAILLET, *Utilisation de banques d'expression pour le clonage moléculaire de protéines faiblement exprimées. Recherche de marqueurs de l'embryogenèse précoce de la souris. Clonage moléculaire d'une protéine associée au L.E.D. (Lupus Erythémateux Disséminé) (Thèse de Doctorat de 3^e cycle, Paris 6, 1987).*

J.F. NICOLAS et J.L.R. RUBENSTEIN, *Retroviral vectors. (In « Vectors : A survey of molecular cloning vectors and their uses ». R.L. Rodriguez et D.T. Denhardt, Ed., Butterworth Publ., Stoneham, Mass., 493-513, 1987).*

H. JAKOB et J.F. NICOLAS, *Mouse teratocarcinoma cells (Methods in Enzymology, 151, 66-81, 1987).*

C. BONNEROT, D. ROCANCOURT, P. BRIAND, G. GRIMBER et J.F. NICOLAS, *A beta-galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 6795-6799, 1987).

J.J. PANTHIER et H. CONDAMINE, *Expression of ecotropic MuLV in ovaries of SWR/J-RF/J hybrid mice* (*Ann. Inst. Pasteur/Virol.*, 139, 409-422, 1987).

M.H. BUC-CARON, H. CONDAMINE et D. KERJASCHKI, *Rat Heymann nephritis antigen is closely related to brushin, a glycoprotein present in early mouse embryo epithelia* (*Ann. Inst. Pasteur/Immunol.*, 139, 707-722, 1987).

J.V. BARNIER, O. BENSAUDE, M. MORANGE et C. BABINET, *Mouse 89 Kd heat shock protein : two polypeptides with distinct developmental regulation* (*Exp. Cell. Res.*, 170, 186-194, 1987).

V. MEZGER, O. BENSAUDE et M. MORANGE, *Deficient activation of heat shock gene transcription in embryonal carcinoma cells* (*Dev. Biol.*, 124, 544-550, 1987).