

Génétique cellulaire

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

Le cours, cette année, a porté sur « Développement embryonnaire et facteurs de croissance ». L'une des propriétés les plus remarquables de l'œuf fécondé, c'est de se développer presque toujours normalement, sans la moindre instruction venue du dehors. Il est difficile d'imaginer comment un tel résultat peut être acquis autrement qu'en amplifiant et corrigeant constamment des différences entre cellules ou groupes de cellules. Selon les idées actuellement en cours, un petit nombre de substances morphogénétiques doit être localisé dans l'œuf fécondé. Après ségrégation de ces substances dans des cellules séparées par clivage, les cellules de cytoplasmes différents interagissent pour former de nouveaux types cellulaires qui, à leur tour, vont induire de nouvelles différences. Les groupes de cellules et leurs descendances passent ainsi par des séries d'états différents dans lesquels elles deviennent temporairement capables de répondre à certains signaux, signaux qui peuvent être soit un composant intracellulaire concentré par localisation ou par division inégale, soit un stimulus inducteur. La série d'états par quoi passent une cellule et ses filles reflète une détermination progressive car il devient de plus en plus difficile de détourner la cellule de son destin de développement terminal.

Comme exemple de substance morphogénétique dans l'œuf, on a discuté alors les propriétés du produit du gène *bicoïd* chez la *Drosophile*. Les ARN messagers *bicoïd* sont synthétisés dans les cellules nourricières qui les injectent dans la région antérieure de l'ovocyte. Là, ils restent ancrés, sans être traduits, dans le pôle antérieur de l'œuf. La protéine ne commence à être synthétisée que plus tard, après fécondation. Elle diffuse progressivement vers l'arrière, réalisant un gradient antéropostérieur. Quand les noyaux du syncytium migrent et viennent se ranger le long de la paroi de l'œuf, ils se trouvent ainsi en présence de concentrations variables de protéine *bicoïd*. Il est vraisemblable que chaque noyau calcule la concentration de protéine qui lui est échue et que son activité s'ajuste en conséquence.

Le reste du cours a été essentiellement consacré aux phénomènes dits « d'induction », c'est-à-dire de transfert d'information d'une cellule à une

autre. Le plus bel exemple en est le phénomène mis en évidence par Spemann dans les années 1915-1923 : l'induction du tissu nerveux chez les Amphibiens. On a décrit en détail les expériences de Spemann qui consistent à greffer, sur un embryon, un fragment issu de laèvre dorsale d'un blastopore prélevé sur un autre embryon et à montrer l'existence d'un « organisateur primaire ». On a rappelé ensuite les expériences de Gehrart sur l'établissement de la polarité et les modifications qu'on peut apporter par rotation de l'œuf. L'expérience originale de Spemann concernait la capacité de laèvre du blastopore à induire le tube neural et toutes les structures de l'axe mésodermique du côté dorsal. Dans les années 60, Niewkoop s'est intéressé aux événements plus précoces, notamment à la formation du tissu mésodermique. Par des expériences simples, il a montré qu'un fragment d'endoderme prélevé sur le pôle végétatif induisait la formation de mésoderme sur un fragment d'ectoderme prélevé au pôle animal.

Avec ce système, facile à manipuler expérimentalement, John Gurdon a cherché à poursuivre l'étude de l'induction avec des marqueurs moléculaires. Il est arrivé ainsi à définir les principaux paramètres de l'activation des gènes déterminant la structure des actines cardiaque et squelettique. Dès lors la vieille question de la nature de l'inducteur, dont la recherche était restée jusque-là si décevante, pouvait être reprise. Plusieurs lignes de recherche (lignée de cellules en culture produisant l'inducteur, utilisation de facteurs de croissance purifiés, repérage d'ARN-messagers localisés dans l'embryon) ont récemment conduit à des conclusions semblables. Selon toute apparence, « l'inducteur » du mésoderme serait composé de un ou plusieurs facteurs de croissance, du type « facteur de croissance fibroblastique » (FGF) et/ou « facteur de transformation β » (TGF β). Toutes ces expériences ont été décrites en grand détail.

Chez la Drosophile, on a maintenant repéré plusieurs gènes qui sont impliqués dans des interactions cellulaires et dont les produits possèdent une structure apparentée à celle de certains facteurs de croissance isolés des mammifères. Le complexe de gènes « Décapentaplégiques » (*Dpp*) gouverne la structure et le développement de nombreux disques imaginaux. Un grand nombre de mutants a été isolé qui présentent des phénotypes très divers. La région *Dpp* a été clonée. La séquence en est déterminée et les messagers repérés. La transcription de la région semble très complexe avec des exons communs à plusieurs messagers et d'autres qui sont transcrits de manière alternative. Dans la région carboxy-terminal des exons communs traduits, on note une région de 100 acides aminés étroitement apparentés à une famille de 4 polypeptides connus chez les mammifères ; TGF β , inhibines A et B et « Mullerian Inhibiting Substance » (MIS). Le polypeptide *Dpp* contient 3 paires de résidus arginines près de la région de clivage qu'on attend par homologie avec le TGF β . En outre les 7 cystéines connues chez les peptides de mammifères se retrouvent dans la protéine de Drosophile.

On connaît toute une série de gènes impliqués dans la neurogenèse de la *Drosophile*, et notamment dans la décision de certaines cellules de devenir soit épidermiques, soit nerveuses. Le gène *Notch* détermine une protéine de 2 703 acides aminés avec une séquence hydrophobe qui correspond probablement à une région transmembranaire ; une séquence intracellulaire d'environ 1 000 acides aminés avec des séquences présentant d'étroites analogies avec celles des gènes *SW16* et *cdc10*, qui, chez la levure, interviennent dans les régulations du cycle cellulaire ; un domaine extracellulaire de 1 700 acides aminés qui présente une séquence de 38 acides aminés, avec 6 cystéines, répétées 36 fois. Cette séquence de 38 acides aminés présente une analogie étroite avec la séquence de l'EGF. Un autre « neurogène » appelé « Delta » contient également une séquence où l'unité EGF se trouve répétée 9 fois.

Chez le petit Nématode *Caenorhabditis elegans*, le gène *lin 12*, déterminant un certain lignage cellulaire, possède également, dans la séquence protéique qu'il détermine, une homologie avec l'EGF : dans sa région extracellulaire, on trouve, comme chez *Notch*, une séquence de type EGF répétée 16 fois. La région intracellulaire contient également une séquence voisine de celles trouvées dans les gènes de levure *cdc10* et *SW16*.

On a discuté très en détail ces différentes structures et leurs propriétés, tant génétiques que biochimiques et moléculaires. Elles fournissent de nouveaux et très démonstratifs exemples de bricolage moléculaire ; c'est-à-dire de motifs conservés au cours de l'évolution, mais combinés de manières diverses pour former des molécules de fonctions variées.

Pour conclure, on a repris les différentes familles de facteurs de croissance connus chez les mammifères et discuté ce qu'on savait de leur présence et leur rôle au cours du développement embryonnaire.

F. J.

SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires sur les protéines intervenant dans la régulation de l'expression génétique.

M. Olivier BENSUADE, Sous-Directeur de laboratoire au Collège de France, a fait un séminaire sur les protéines de choc thermique, auxiliaires de diverses fonctions cellulaires.

M. Marcel DOREE, Professeur à l'Université de Montpellier, a proposé un exposé sur « MPF » : Identification et régulation de son activité au cours du cycle cellulaire.

M. Philippe DUPREY, Maître de conférences à l'Université Paris VII, a présenté l'« homéobox » et le développement de la Souris : cas de gènes contenant des séquences de type Antennapedia et caudal.

M. Frédéric ROSA, Chargé de recherche à l'I.N.S.E.R.M., a fait le point sur les approches moléculaires de l'induction embryonnaire : rôle des facteurs de croissance.

M. Patrick STRAGIER, Directeur de recherche au C.N.R.S., a discuté de la morphogénèse et de la compartimentation de l'expression génétique au cours du développement chez *Bacillus subtilis*.

M^{me} Audrey ALBERGA, Chargée de recherches à l'I.N.S.E.R.M., a décrit Snail : un gène clé dans la mise en place de l'axe dorso-ventral chez la Drosophile ?

M. Hughes DE THE, Interne des Hôpitaux de Paris, a fait le point sur les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque.

M. Marcel MECHALI, Directeur de recherches au C.N.R.S., a fait un exposé sur les protooncogènes et le développement embryonnaire.

M^{me} Odile KELLERMANN, Maître de Conférences à l'École Normale Supérieure de Paris, a fait un séminaire sur « Immortalisation de lignées cellulaires correspondant à des stades précoces de l'embryogenèse de la 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. Notre groupe s'est récemment scindé en deux unités distinctes et indépendantes dont l'une est dirigée désormais par Jean-François Nicolas. Comme précédemment, l'étude de la différenciation cellulaire 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 CELLULES PRÉCURSEURS CHEZ L'EMBRYOM DE SOURIS

(Marie-Hélène BUC et Odile KELLERMANN)

L'objectif de cette étude est l'analyse cellulaire et moléculaire des mécanismes impliqués dans la détermination et la différenciation des cellules au cours de l'embryogenèse de la souris. Durant les trois dernières années, on a

mis au point une méthode d'immortalisation des cellules à des stades précoces de développement, on a construit un plasmide, pK4, contenant les oncogènes de SV40 sous le contrôle du promoteur E1a de l'adénovirus, actif très tôt dans l'embryogenèse. Des souris transgéniques hébergeant pK4 ont été isolées. Des lignées transformées par pK4 ont été obtenues à partir du tératocarcinome. L'expression des oncogènes de SV40 au début de la différenciation permet d'immortaliser et de cloner des cellules souches orientées vers la voie neuroectodermique ou mésodermique ou endodermique. Ces lignées immatures ont un phénotype stable en culture. Elles sont tumorigènes et conservent cependant la capacité de se différencier après induction *in vitro* ou *in vivo*, selon un programme cohérent et reproductible. Deux de ces clones seront étudiés en priorité : un clone précurseur de cellules sérotoninergiques et un clone mésoblastique ostéogénique. Les recherches sont poursuivies selon deux axes principaux :

a) Études physiologiques et pharmacologiques. Mise en place de récepteurs au cours de la différenciation. Réponses aux hormones, aux neuro-médiateurs, aux agents pharmacologiques.

b) Étude de l'expression des gènes. Recherche des gènes déterminant des protéines induites lors de la différenciation (transporteur de la sérotonine, protéines spécifiques des ostéoblastes). Recherche de gènes de « détermination ».

II. CRÉATION DE SOURIS MUTANTES PAR INACTIVATION ET MODIFICATION DE GÈNES DÉFINIS

(Patrice BLANCHET, Philippe BRULET, François CONQUET, Jean-Louis ESCARY, Yvan LALLEMAND, Hervé LE MOUËLLIC)

On met au point une technologie nouvelle permettant d'obtenir des souris mutantes pour un gène donné. Elle est basée sur une mutagenèse *in vitro* suivie de l'introduction de la mutation dans le gène par les mécanismes de recombinaison homologue dans des cellules embryonnaires souches (ES) totipotentes. Après sélection, ces cellules mutantes pour le gène étudié seront réimplantées dans un blastocyste afin de coloniser tous les tissus, y compris la lignée germinale de la souris chimère qui en résultera.. La mutation pourra ainsi être transmise de manière héréditaire à l'état hétérozygote ou homozygote. Une attention particulière sera apportée au remplacement d'un gène murin par un gène humain, défectif ou non. De tels mutants pourraient servir en tant que modèles animaux pour l'étude de maladies humaines d'origine génétique, virale, etc. Cela permettra la mise au point sur l'animal de traitement applicable à l'homme. Cette technologie est indispensable pour l'analyse génétique de l'embryogenèse des mammifères. Plusieurs gènes sont étudiés :

a) L'homéogène Hox 3.1 : de nos expériences par hybridation *in situ* sur coupe histologique, il ressort que l'homéogène Hox 3.1 joue un rôle important dans le processus de régionalisation de l'embryon de souris. Des souris et embryons portant des mutations Hox 3.1, à l'état hétérozygote et homozygote seront très précieux pour étudier la fonction de ce gène au cours du développement. Au niveau moléculaire, la caractérisation de l'unité de transcription et du promoteur est poursuivie. Le mode d'action de la ou des protéine(s) sera établi à l'aide d'antisérum de lapin et d'anticorps monoclonaux.

b) Le gène déterminant un facteur de croissance spécifique des cellules souches embryonnaires ES : on a isolé le cADN et des clones génomiques murins pour ce facteur appelé LIF ou HILDA. Ce facteur a été d'abord identifié dans certaines cellules transformées du système immunitaire. Par hybridation *in situ* sur coupe, on cherche à identifier les cellules productrices de ce facteur de croissance qui agit sur les cellules non différenciées dans l'embryon précoce. Des souris mutantes pour ce gène devraient apporter des informations nouvelles sur l'embryogenèse. Une attention spéciale sera donnée à l'isolement des récepteurs de ce facteur à partir de cellules ES.

Grâce à cette technologie, on espère isoler, par des tests fonctionnels appliqués directement à l'embryon, de nouveaux gènes intéressants. On cherche notamment des gènes impliqués dans la neurogenèse et la myogenèse ainsi que dans la détermination des cellules de l'ectoderme embryonnaire entre le jour 3, 5 et 7 du développement murin.

III. L'EXPRESSION TRÈS PARTICULIÈRE DES PROTÉINES DE CHOC THERMIQUE AU COURS DE L'EMBRYOGENÈSE DE LA SOURIS

(Olivier BENSAUDE, Michel MORANGE, Valérie MEZGER)

Nous avons montré, il y a déjà quelques années, que l'expression de certaines des protéines de choc thermique (HSC73, HSC59, HSP86) était très forte dans l'embryon précoce avant implantation ainsi que dans les cellules de carcinome embryonnaire. Cette expression élevée s'accompagnait de l'absence d'induction, dans l'embryon précoce, avant le stade blastocyste ainsi que dans certaines lignées de carcinome embryonnaire, de la protéine de choc thermique moyenne de la souris, la HSP72. Nous avons montré que la régulation de cette expression se situait au niveau transcriptionnel. Nous avons caractérisé dans des cellules différenciées ou des cellules de carcinome embryonnaire les facteurs protéiques qui, en se fixant en amont des gènes de choc thermique, en activaient la transcription. Le dosage de l'activité de ces facteurs nous a permis d'émettre une hypothèse qui expliquerait la synthèse très particulière des protéines de choc thermique dans les cellules de carcinome embryonnaire

et dans l'embryogenèse. De plus, l'étude du système de carcinome embryonnaire s'est avérée être un outil très puissant pour caractériser les différentes étapes du processus qui conduit à l'activation des gènes de choc thermique.

IV. ÉTUDE MOLÉCULAIRE DES INTERACTIONS CELLULAIRES AU COURS DE L'EMBRYOGENÈSE DE LA SOURIS

(François JACOB, Nadine PEYRIERAS)

L'uvomoruline est une glycoprotéine de 120 000 daltons présente à la surface des blastomères de l'embryon de souris. Elle participe, tout au long du développement embryonnaire, à un mécanisme d'adhérence cellulaire dépendant du calcium et caractéristique des tissus épithéliaux. Elle appartient à la famille dite des « cadhérines » qui présentent d'importantes homologies éventuellement décelées par des outils immunologiques. Des anticorps anti-uvomoruline ont permis de repérer la présence d'une cadhérine dans des préparations de membranes de capillaires de moëlle épinière et de cerveau. L'identité de cette molécule avec l'uvomoruline a pu être établie. L'uvomoruline semble jouer un rôle dans l'intégrité des épithéliums. Elle pourrait intervenir de manière comparable dans les endothéliums de certains vaisseaux et jouer un rôle fonctionnel dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique.

V. EXPRESSION D'UN RÉTROVIRUS DANS LES GONADES DE LA SOURIS : INFECTION DE LA DESCENDANCE ET TRANSMISSION HÉRÉDITAIRE

(Hubert CONDAMINE, Pascal NOUVEL, Jean-Jacques PANTHIER)

Lorsque des souris femelles de la lignée SWR/J sont infectées à la naissance par un rétrovirus MuLV provenant de la lignée RF/J, on observe que 10 % environ de la descendance des femelles infectées ont intégré dans leur génome et transmettent dans le génome de leurs descendants une ou plusieurs copies des gènes du virus. On a cherché à comprendre ce passage d'un virus exogène à un virus endogène en examinant la production de particules virales dans les gonades des souris infectées. Les différentes étapes de l'expression du virus ont pu être suivies : RNA messagers décelés sur coupes histologiques par hybridation *in situ* ; protéines de l'enveloppe virale révélées par immunofluorescence ; bourgeonnement des particules virales à la surface des cellules suivi en microscopie électronique (collaboration avec Pierre Gounon). Une spécificité tissulaire d'expression du virus dans les gonades a pu être clairement documentée : dans les ovaires au niveau de l'enveloppe des follicules (cellules de la thèque) ; dans les testicules au niveau des cellules de Leydig.

Le virus MuLV qui apparaît capable d'infecter les gonades d'une souris infectée à la naissance a été cloné et son génome séquencé. Il devrait constituer un outil précieux pour réaliser des vecteurs permettant l'introduction de gènes étrangers dans la Souris. Diverses constructions utilisables à cet effet sont actuellement en cours de réalisation.

VI. ÉTUDES DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA SEGMENTATION DE L'EMBRYON DE DROSOPHILE

(Yves JACOB, Jean-René MARTIN, Roger OLLO)

On étudie l'embryogenèse précoce de la Drosophile en cherchant à comprendre comment s'élaborent les « plans » du développement. Pour cela, on a recours à deux stratégies :

a) L'une plus globale consiste à produire de nombreuses lignées à l'aide d'un mutagène biologique, puis à sélectionner les mutations létales qui altèrent différents processus de développement chez l'embryon. On utilise ces lignées pour cloner les gènes identifiés et étudier leur fonction au cours du développement précoce.

b) Afin de mettre à jour les interactions régulatrices entre gènes impliqués dans les étapes précoces de la segmentation, on a choisi comme approche de déterminer les plus petites séquences en 5' qui sont nécessaires pour la régulation correcte de l'expression du gène Kruppel.

Pour cette étude, on construit des lignées transgéniques en utilisant des gènes hybrides constitués de différents fragments en 5' du gène Kruppel fusionnés au gène marqueur Lac Z de *E.coli*. Les embryons ayant intégré ces différentes constructions sont analysés par immunocytochimie au cours du développement. Cette méthode a déjà permis d'identifier plusieurs séquences responsables de la localisation de la protéine Kruppel au cours de l'embryogenèse.

PRINCIPALES PUBLICATIONS

H. LE MOUËLLIC, H. CONDAMINE et P. BRULET, *Pattern of transcription of the homeogene Hox 3.1 in the mouse embryo (Genes & Development, 2, 125-135, 1988).*

H. LE MOUËLLIC, Y. LALLEMAND, P. BLANCHET, D. BOULLIER et P. BRULET, *Genetic analysis of Hox 3.1, a mouse homeogene. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology (Gene transfer in mammals. New Series, 1988).*

J.J. PANTHIER et H. CONDAMINE, *La mutagenèse insertionnelle chez la souris (Médecine/Sciences, 4, 568-575, 1988).*

J.J. PANTHIER, H. CONDAMINE et F. JACOB, *Inoculation of newborn SWR/J females with an ecotropic murine leukemia virus can produce transgenic mice (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 1156-1160, 1988).*

J. PERREAU, A. LILLENBAUM, M. VASSEUR et D. PAULIN, *Nucleotide sequence of the human vimentin gene and regulation of its transcription in tissues and cultured cell (Gene, 62, 7-11, 1988).*

O. BENSAUDE, *Ethidium bromide safety ; Adsorption on activated charcoal (Trends in Genetics, 4, 89-90, 1988).*

V.T. NGUYEN, M. MORANGE et O. BENSAUDE, *Firefly luciferase luminescence assay using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells (Anal. Biochem., 171, 404-408, 1988).*

V. LEGAGNEUX, M.F. DUBOIS, M. MORANGE et O. BENSAUDE, *Phosphorylation of the 90 kDa heat shock protein in heat-shocked Hela Cells lysates (FEBS Letters, 231, 417-420, 1988).*

M.F. DUBOIS, V. MEZGER, M. MORANGE, C. FERRIEUX P. LEBON et O. BENSAUDE, *Regulation of the heat-shock response by interferon in mouse L cells (J. Cell. Physiol., 137, 102-109, 1988).*

O. BENSAUDE et P. AVNER, *Did Adam marry Eve ? (Science, 239, 127, 1988).*