

Génétique cellulaire

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

Le cours, cette année, a porté sur « Protooncogènes et développement embryonnaire ». On a tout d'abord rappelé les différentes catégories de protooncogènes. On a plus particulièrement décrit les propriétés de ceux qui, comme *myc*, *fos* et *jun*, jouent le rôle de facteurs de transcription. On s'est ensuite attaché à préciser la notion d'antioncogènes, en prenant comme exemple le gène impliqué dans les rétinoblastomes. En 1971, Alfred Knudson, se basant sur une étude statistique couvrant 48 cas de rétinoblastomes, tant « familiaux » que « sporadiques », a proposé une explication simple pour une situation apparemment complexe. Knudson est parti de l'idée que le cancer est dû à plusieurs mutations et que ces mutations peuvent se trouver chez un individu par suite de deux mécanismes : soit par héritage venant d'un parent, soit par mutation somatique survenant pendant la vie de l'individu.

En 1973, Comings a cherché à unifier les données sur les cancers, obtenues d'une part à partir des oncogènes viraux, d'autre part avec les rétinoblastomes. Il a proposé une théorie générale basée sur les points suivants :

1) Toutes les cellules possèdent une série de gènes de structure (Tr) capables de déterminer la synthèse de facteurs transformants qui peuvent libérer la cellule de contraintes limitant sa multiplication.

2) Dans les cellules de l'adulte, la synthèse de ces facteurs est réprimée par des paires (diploïdes) de gènes régulateurs, certains de ces gènes ayant une spécificité de tissu.

3) Les locus Tr sont activés temporairement à certaines étapes de l'embryogenèse et, dans certains cas, à certaines étapes du cycle cellulaire chez l'adulte.

4) Des tumeurs spontanées ou induites par des agents chimiques ou physiques surviennent par suite de doubles mutations dans l'un des jeux de gènes régulateurs réprimant l'expression des gènes Tr, ce qui aboutit à la transformation de la cellule.

5) Les tumeurs héréditaires autosomiques dominantes comme le rétinoblastome sont dues à l'acquisition, par la lignée germinale, d'un gène régulateur muté. Une deuxième mutation dans l'autre gène homologue, survenant après coup, dans une cellule de la rétine, entraîne la formation d'une tumeur.

6) Les virus oncogènes se sont formés en extrayant des gènes Tr de la cellule hôte, gènes qui, alors soumis à la régulation virale, deviennent transformants.

De nombreux aspects de cette hypothèse ont été confirmés par les travaux effectués depuis lors sur les rétinoblastomes. Le gène en cause (Rb) a été localisé, chez l'homme, sur le chromosome 13, région q14. Il a été cloné, sa séquence établie. Le gène correspond à 27 exons dispersés sur quelques 200 kilobases d'ADN génomique. La protéine Rb a été isolée. C'est une phosphoprotéine de 110 kilodaltons (pp110^{Rb}).

Certaines oncoprotéines, produites par des virus oncogènes comme E1A (adénovirus) ou grand T (SV40) ont la propriété de s'associer à pp 110^{Rb} et l'activité transformante de ces oncoprotéines semble liée à leur capacité de former des complexes avec pp 110^{Rb}. Enfin, récemment on a montré que :

1 - La phosphorylation de la protéine Rb dépend de l'état des cellules. Chez les cellules en repos -fibroblastes, lymphocytes, cellules endothéliales- la plus grande partie de la protéine Rb est déphosphorylée. Au contraire, chez ces mêmes cellules en voie de prolifération, les molécules de la protéine Rb sont presque toutes phosphorylées.

2 - L'analyse du cycle cellulaire, dans des populations synchronisées, indique que en G0/G1 pratiquement toute la protéine Rb est déphosphorylée. Pendant les phases S et G2, au contraire, elle est très fortement, sinon complètement, phosphorylée.

Ce cycle phosphorylation/déphosphorylation rappelle celui trouvé avec la protéine kinase cdc2 dont l'activité est déterminée par l'état de phosphorylation et par la fixation d'autres protéines, les cyclines. Dans ce cas, c'est la protéine non phosphorylée qui paraît active. Que la phosphorylation puisse ainsi moduler la fonction de la protéine Rb vient du fait que seule la protéine Rb non phosphorylée co-précipite avec le facteur grand T de SV40..

Deux hypothèses semblent pouvoir rendre compte des propriétés trouvées à la protéine Rb :

1) Rb pourrait empêcher la sortie de G1 en gouvernant le début de la phase S. Rb déphosphorylée bloquerait la mise en route de la synthèse d'ADN. L'inactivation de Rb, soit par phosphorylation chez les cellules normales, soit par mutation ou par fixation d'autres protéines chez les cellules transformées, permettrait l'entrée en phase S. Cette hypothèse s'accorde à l'idée que les virus oncogènes à ADN ont évolué en réquisitionnant certaines des protéines cellulaires réprimant la synthèse d'ADN cellulaire de manière à améliorer la réplication de l'ADN viral.

2) la présence de Rb déphosphorylée formerait une « fenêtre » pendant laquelle est permise la sortie du cycle. La déphosphorylation de Rb représenterait un élément dans une chaîne de signaux permettant aux facteurs du milieu (confluence, absence de facteurs nutritifs, présence d'inhibiteurs de croissance ou d'inducteurs de différenciation) d'orienter la cellule de G1 vers la quiescence et de s'engager dans la différenciation.

Ces deux hypothèses ont chacune des avantages et des inconvénients. Une étude détaillée du cycle cellulaire dans des lignées de rétinoblastome ou dans des cellules exprimant soit E1A soit grand T devrait permettre de choisir.

On a ensuite analysé les diverses situations dans lesquelles la formation de certaines tumeurs semble liée au passage d'un état hétérozygote à l'état homozygote pour certains gènes. C'est le cas notamment d'ostéosarcomes (dus au même gène Rb), aux néphroblastomes de Wilms, à certaines tumeurs du poumon, du sein, du colon.

Dans une seconde partie, on a étudié l'homologie récemment trouvée entre des oncogènes de mammifères et des gènes qui gouvernent certains aspects de la morphogenèse chez la *Drosophile*. Tel est le cas de l'oncogène *int-1*. Celui-ci est un gène activé dans les tumeurs mammaires de la Souris à la suite de l'insertion, dans le génome, du virus de la tumeur mammaire de la Souris. Ce virus est capable de transformer, en culture, les cellules de l'épithélium mammaire mais non celles d'autres lignées. L'ADN du gène *int-1* a été cloné, sa séquence établie. De la séquence on peut prévoir que la protéine déterminée par ce gène est sécrétée. Chez l'embryon, le gène semble être exprimé, entre le 9^e et le 15^e jour, dans le cerveau et dans la moelle épinière. Chez l'adulte mâle, on le trouve exprimé dans les spermatozoïdes exclusivement. Curieusement, le gène ne semble pas exprimé dans le tissu mammaire ni aucun autre tissu de la femelle.

Le gène *wingless* fut à l'origine repéré, dans la *Drosophile*, par une mutation qui transformait l'aile en une réplique du notum, autre composant du thorax. Récemment, d'autres mutations du même gène ont été isolées. Ce sont des mutations récessives, létales pour l'embryon homozygote, du type « polarité segmentaire ». Chez les embryons mutants, on trouve le nombre normal de segments mais dans chaque segment manquent certaines des structures cuticulaires. Le gène *wingless* a été cloné et son expression dans l'embryon précisée. Il est transcrit le long d'une bande de trois ou quatre cellules dans chaque segment ; soit quelques seize bandes le long de l'embryon. Point important : chez les animaux chimères, formés de groupes de cellules de génotype sauvage et de groupes de cellules de génotype mutant, les ailes sont normales. En d'autres termes, le phénotype des cellules mutantes peut redevenir normal au voisinage de cellules de type sauvage. Le produit du gène *wingless* semble donc être diffusible d'une cellule à ses voisines.

Ces deux histoires séparées, celle de l'oncogène *int-1* de la Souris et celle du gène *wingless* de la Drosophile se sont récemment rencontrées. En utilisant une sonde de Souris, on a recherché et on a trouvé, dans le génome de Drosophile, une séquence homologue de *int-1*. Par hybridation sur les chromosomes géants de glande salivaire, cette séquence de Drosophile a été localisée à la même position cytologique que le gène *wingless*. Les séquences des deux cADN de Drosophile, celle homologue de *int-1* et celle de *wingless*, sont les mêmes. Et l'injection d'ARN « antisens » de la séquence *int-1* dans des œufs de type sauvage produit des embryons qui présentent un phénotype *wingless*.

Si le rôle du proto-oncogène *int-1* dans la morphogenèse est ainsi bien établi chez la Drosophile, il reste flou dans le cas de la Souris. Mais, récemment, l'étude du Xénope a montré que, chez les vertébrés aussi, ce gène intervenait dans le développement. En utilisant comme sonde le cADN de Souris, on a pu repérer et cloner le gène *int-1* de Xénope. Si l'on injecte, dans des œufs fécondés, l'ARN messager de ce gène, celui-ci est traduit et la protéine distribuée dans l'ensemble de l'œuf. La quasi-totalité des embryons survivent et se développent en gastrulas apparemment normales. Mais au stade morula, on trouve que la plaque neurale bifurque dans la région antérieure où elle est flanquée de deux notochordes, tandis qu'elle s'épaissit dans la région postérieure. L'effet est aboli si l'on enlève de la protéine la séquence signal permettant la sécrétion. Il semble ainsi que l'expression ectopique de *int-1* conduit à la formation de deux axes antéro-postérieurs. Ce qui montre bien le rôle de ce gène dans les processus de morphogenèse chez les vertébrés.

F. J.

SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires sur certains aspects moléculaires du développement embryonnaire.

M. Patrick CHARNAY, Directeur de recherche à l'I.N.S.E.R.M., a donné un exposé sur la recherche de gènes impliqués dans le contrôle du développement chez la Souris.

M^{me} Eliane MOHIER, Directeur de recherche au C.N.R.S., a décrit le rôle du gène K10 dans le déterminisme de l'axe dorso-ventral chez l'embryon de Drosophile.

M. Olivier BENSAUDE, Sous-Directeur de laboratoire au Collège de France, a fait un séminaire sur la régulation de l'expression génétique avant et après fécondation de l'œuf de mammifère : cas de gènes de choc thermique.

M. Michel DARMON, Professeur au Centre International de Recherches Dermatologiques de Sophia Antipolis, a fait le point sur les rôles respectifs de l'information de position et de concentration d'acide rétinoïque dans la différenciation et la morphogenèse de l'épiderme.

M. Jean-François MOREAU, Chargé de recherche à l'I.N.S.E.R.M., a fait un exposé sur la caractérisation et l'isolement de l'ADNc d'une nouvelle cytokine : « HILDA ».

M. Jacques POUYSSEGUR, Directeur de recherche au C.N.R.S., a fait le point sur les signaux de transduction et contrôle de la prolifération cellulaire.

M. Laurent MEIJER, Chargé de recherche au C.N.R.S., a fait un exposé sur le contrôle intracellulaire de la division.

M. Jacques DUMONT, Professeur à l'Hôpital Universitaire d'Erasmus à Bruxelles, a fait un séminaire sur le contrôle de la prolifération cellulaire et de la différenciation dans une cellule épithéliale : la cellule thyroïdienne.

M. Jacques MARTAL, Directeur de la Station de Physiologie Animale de l'INRA, a discuté des trophoblastines, interférons embryonnaires.

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

Les recherches de l'Unité de Génétique cellulaire sont centrées sur l'étude du développement de l'embryon, chez la Drosophile et la Souris, pendant les stades les plus précoces. On s'attache plus précisément à l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ce développement.

I. REMPLACEMENT SPÉCIFIQUE DE GÈNES DANS LE GENOME MURIN : CRÉATION DE LIGNÉES DE SOURIS MUTANTES

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

En utilisant le système de recombinaison génétique des cellules embryonnaires souches, un gène choisi peut être inactivé et une lignée de souris mutantes créée. Nous avons développé une nouvelle procédure pour remplacer spécifiquement un gène murin par un autre, par exemple le gène *LacZ* de *E.coli*. Dans les souris transgéniques le gène de la β -galactosidase dont l'activité peut être suivie *in situ* dans les embryons, se retrouve sous la commande du promoteur du gène muté. Cette technique permet une évaluation directe, au niveau cellulaire, des effets de l'inactivation du gène. L'apparition du phénotype peut être suivie peu à peu au cours de l'embryogenèse dans différents contextes génétiques. Soulignons en particulier l'intérêt de la technique pour suivre les effets de mutations homozygotes et/ou létales. Combinée avec des expériences de transplantation, cette technologie de remplacement offre un moyen unique d'établir des corrélations entre l'activité d'un promoteur spécifique et la détermination de cellules embryonnaires. En fonction de la nature du couple « gènes remplacé et remplaçant », de nombreuses applications sont possibles.

Pour la première fois, nous avons réussi cette approche avec un homéogène murin *Hox-3.1* (voir photos jointes). Il apparaît, en effet, de plus en plus évident que le plan de construction des embryons, des insectes aux mammifères a été façonné par les forces de l'évolution suivant des principes moléculaires identiques. Le remplacement de l'homéogène *Hox-3.1* par *LacZ* devrait nous permettre d'établir le rôle exact des « homéogènes » au cours de l'embryogenèse des mammifères. Cette approche est aussi poursuivie avec divers gènes intéressants, proto-oncogènes, facteurs de croissance embryonnaires, gènes de régulation de la myogenèse ainsi que du système nerveux central. La même technologie peut aussi être utilisée pour créer des souris qui seraient des modèles animaux pour certaines maladies humaines.

II. TRANSCRIPTION DES GÈNES DE CHOC THERMIQUE AU COURS DE L'EMBRYOGÈNESE PRÉCOCE DE LA SOURIS

(Olivier BENSAUDE, Michel MORANGE et Valérie MEZGER)

Chez les mammifères, après la fécondation, la synthèse de protéines de choc thermique est la première manifestation clairement décelable de la transcription du génome. Puis, la synthèse de la protéine majeure HSP68 (thermoinductible) cesse et jusqu'au stade blastocyste on ne peut pas obtenir sa synthèse après un choc thermique : de manière générale il n'y a pas

d'activation de la transcription par les stress des gènes thermoinductibles. Le carcinome embryonnaire (CE) est un modèle d'étude des cellules de l'embryon précoce de souris. Certaines lignées de CE se comportent comme les cellules de l'embryon au stade 8-cellules : le choc thermique ne déclenche pas la transcription des gènes thermoinductibles alors que les gènes constitutifs sont très fortement exprimés en absence de stress. Nous avons montré que dans ces cellules le facteur de transcription HSF spécifique des gènes thermoinductibles était d'une part, déjà activé en absence de stress et que d'autre part, les stress provoquaient sa désactivation.

En collaboration avec Jean-Paul Renard et Charles Babinet de l'unité de Génétique des Mammifères, nous développons l'étude du facteur HSF dans les embryons et la caractérisation du rôle de certaines protéine-kinases dans la mise en route du génome caractérisée par la transcription des gènes de choc thermique.

III. ÉTUDE D'UNE PROTÉINE RÉGULATRICE PRODUITE PAR UN GÈNE A HOMÉOBOITE

(Nadine PEYRIERAS)

Des immun-sérums dirigés contre la protéine Hox 3.1 ont été préparés dans le but de préciser le rôle éventuel des gènes d'un complexe *Hox* dans la détermination de l'axe antéro-postérieur au cours du développement de la souris. Des anticorps polyclonaux de rat et de lapin ont été obtenus par immunisation avec une protéine de fusion Hox-3.1/ β -galactosidase. Une protéine de 35 kDa a été ainsi mise en évidence par immunoréplique dans des extraits de moëlle épinière mais pas dans le cerveau d'embryon de 12,5 jours.

On a également isolé des anticorps monoclonaux de rat dirigés contre le produit de *Hox-3.1*. Une analyse par immunoréplique de gels bi-dimensionnels semble indiquer que l'un des anticorps (243 A) reconnaît différents polypeptides modifiés par des réactions post-traductionnelles. Ces protéines pourraient correspondre à l'expression de plusieurs gènes des complexes *Hox*. L'anticorps 243 A révèle le même profil protéique au cours de l'embryogenèse à partir du jour 12,5 après fécondation et chez la souris nouveau-née. Entre 8,5 et 12,5 jours, la transcription du gène *Hox-3.1* se limite progressivement à la moëlle épinière. Il semble y avoir une corrélation avec des changements dans le profil protéique révélé par 243 A.

IV. OBTENTION DE SOURIS TRANSGÉNIQUES SANS MANIPULATION D'EMBRYONS : MISE AU POINT DE VECTEURS RÉ- TROVIRAUX

(Hubert CONDAMINE, Jean-Stéphane JOLY, Pascal NOUVEL et Jean-Jacques PANTHIER)

On cherche à tirer parti des propriétés d'un rétrovirus MuLV de la Souris qui, lorsqu'il est inoculé peu après la naissance à des femelles de la lignée SWR/J, colonise les ovaires et infecte les cellules reproductrices. En conséquence, environ 10 % des descendants de telles femelles portent une ou plusieurs copies des gènes de ce rétrovirus intégrée(s) de façon stable parmi leurs propres gènes cellulaires. Le but est d'utiliser ce virus comme vecteur pour introduire, parmi les gènes de la souris SWR/J, un gène étranger quelconque choisi à l'avance, par simple inoculation de sourceaux femelles. Pour mettre au point ce système, on a choisi, en guise de gène étranger, le gène de la β -galactosidase d'*Escherichia coli* (gène *Lac Z*). Une construction n° 1 dérivée du virus MuLV a été obtenue où *Lac Z* remplace 2 des 3 gènes viraux. Pour qu'une telle construction soit propagée par les cellules ovariennes de Souris inoculées, il faut que parmi les gènes cellulaires figurent les 2 gènes viraux enlevés dans la construction n° 1. Une construction n° 2 a donc été mise au point, qui doit permettre après injection dans l'œuf, selon la technique classique d'obtention de souris transgéniques, d'intégrer ces 2 gènes viraux parmi les gènes cellulaires. Ces souris transgéniques sont en cours d'obtention (collaboration avec le Dr. Charles Babinet). Par ailleurs, les propriétés de la construction n° 1 sont actuellement étudiées sur des cellules *in vitro*

ÉTUDE DE LA DROSOPHILE

ÉTUDE DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA SÉGMENTATION DE L'EMBRYON DE DROSOPHILE

(Roger OLLO, Yves JACOB, Jean-René MARTIN et Susan SATHER)

Pour tenter de comprendre comment s'élaborent les « plans de développement » chez l'embryon de Drosophile, nous avons utilisé deux axes de recherche.

a) Une première approche plus globale, a consisté à obtenir des mutations par insertion du transposon P pour constituer une collection de mutants et sélectionner des mutations qui altèrent la morphologie de l'embryon. Nous avons cloné la région génétique de certaines mutations identifiées, afin d'étudier leur fonction au cours du développement. Nos travaux se concentrent principalement sur le mutant à effet maternel *torsolike* qui est impliqué, avec

quatre autres gènes, dans une cascade d'activation aboutissant à définir les parties terminales de l'embryon de *Drosophile*.

b) Afin de comprendre les mécanismes de régulation modulant l'expression génétique au cours du développement, nous avons choisi de construire des gènes hybrides en fusionnant différentes régions du gène *Krüppel* au gène indicateur *Lac Z* de *E. coli* pour produire des mouches transgéniques.

L'analyse, par immunocytochimie, des embryons ayant intégré ces différentes constructions a révélé une régulation complexe de l'expression du gène *Krüppel*, tant par le nombre d'éléments régulateurs distincts que par l'organisation enchevêtrée de ces éléments. Plusieurs éléments de contrôle ont été notamment localisés à l'intérieur des séquences codantes. A présent, nous utilisons le bloc de séquences correspondant à l'un des deux éléments neurogéniques que nous avons définis pour manipuler le système nerveux. Ces expériences ont pour but d'explorer la fonction des neurones qui expriment le gène *Krüppel* au cours de la neurogenèse.

PRINCIPALES PUBLICATIONS

F. JACOB, *L'embryologie devenue moléculaire (Médecine/Sciences, 5, 6-7, 1989)*.

F. JACOB, *Introduction (Société Française de Génétique, 1, 5-8, 1989)*.

J.J. PANTHIER, P. GOUNON, H. CONDAMINE et F. JACOB, *Pattern of expression of ecotropic murine leukemia virus in gonads of inoculated SWR/J mice (J. Virol., 63, 2134-2141, 1989)*.

H. LE MOUËLLIC, Y. LALLEMAND, P. BLANCHET, D. BOULLIER et P. BRULET, *Genetic analysis of Hox 3.1, a mouse homeo-gene (UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. Gene transfer and gene therapy, Alan R. Liss Inc., p. 243-253, 1989)*.

V. RICHOUX, J.J. PANTHIER, A.M. SALMON et H. CONDAMINE, *Acquisition of endogenous ecotropic MuLV can occur before the late one-cell stage in the genital tract of SWR/J-RF/J hybrid females (J. exp. Zool., 252, 96-100, 1989)*.

J.J. PANTHIER, *Infection spontanée de la lignée germinale de la souris par les rétrovirus leucémogènes (Bull.Inst.Pasteur, 87, 337-347, 1989)*.

V.T. NGUYEN, M. MORANGE et O. BENSUADE, *Protein Denaturation during Heat Shock and Related Stress : E. Coli β -galactosidase and Photinus Pyralis Luciferase Inactivation in Mouse Cells (J. Biol. Chem., 264, 10487-10492, 1989)*.

V. LEGAGNEUX, V. MEZGER, C. QUELARD, J.V. BARNIER, O. BENSAUDE et M. MORANGE, *High Constitutive Transcription of the Murine HSP86 Gene in Embryonal Carcinoma Cells* (*Differentiation*, 41, 42-48, 1989).

V. MEZGER, O. BENSAUDE et M. MORANGE, *Unusual Levels of HSE-Binding Activity in Embryonal Carcinoma Cells* (*Mol. Cell. Biol.*, 9, 3888-3896, 1989).

D. MATTEI, A. SCHERF, O. BENSAUDE et L. PEREIRA DA SILVA, *A Heat Shock-Like Protein from the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum Induces Autoantibodies* (*European J. of Immunology*, 19, 1823-1828, 1989).