

TÉRATOCARCINOMES MURINS, LOCUS *T* ET LIGNÉE GERMINALE

G. GACHELIN et M. FELLOUS

*Unité de Génétique cellulaire,
Département de Biologie moléculaire,
Institut Pasteur,
25, rue du Dr Roux,
75015 Paris*

RÉSUMÉ

Plusieurs lignées cellulaires de tératocarcinome primitif ont été établies à partir de tératomes testiculaires murins transplantables. Ces lignées sont susceptibles de donner naissance *in vivo* à la plupart des tissus embryonnaires. Un antiserum dirigé contre une de ces lignées a été préparé dans la souris syngénique au tératome d'origine (129/Sv). Cet antiserum a permis la détection d'un antigène de surface commun à toutes les lignées de tératocarcinome primitif, à l'œuf de souris en segmentation et aux spermatozoïdes. Cet antigène est absent de la surface des autres tissus embryonnaires ainsi que des tumeurs. Il semble donc caractéristique des états précoces du développement embryonnaire. Par absorption quantitative sur spermatozoïdes, on a pu montrer que cet antigène était codé par le gène $+t^{12}$ du *T* locus, un gène qui joue un rôle essentiel dans le développement du blastocyste murin.

Cet antigène est exclusivement localisé sur la zone post-acrosomique du spermatozoïde. On a étudié par immunofluorescence indirecte l'expression de l'antigène $+t^{12}$ au cours de la spermatogénèse. Cet antigène est présent sur les précurseurs diploïdes des spermatozoïdes, tant prépubères qu'adultes. Ces résultats sont discutés du point de vue de leur conséquence sur l'expression haploïde de l'antigène $+t^{12}$.

L'étude de la différenciation embryonnaire précoce de l'œuf de souris est limitée par la rareté de ce matériel. Aussi bien, à part quelques études biochimiques faites à l'échelle cellulaire, la plupart des travaux ont-ils consisté en des interventions physiques sur l'œuf, dont les résultats sont appréciés sur l'embryon tardif, ou sur l'animal post-partum [5, 10, 12, 17]. Une autre manière d'aborder cette étude consiste à rechercher des lignées cellulaires stables qui conservent *in vitro* les propriétés des

cellules ou tissus observés aux différents stades de l'embryogenèse. De telles lignées ont été établies à partir de tératocarcinomes murins [14, 15, 16, 19, 21].

Les tératomes testiculaires apparaissent spontanément dans les souris de la souche 129/Sv [24]. Ces tumeurs contiennent des massifs de cellules primitives indifférenciées hautement malignes, aux dépens desquelles se différencient des secteurs non malins où sont représentés la plupart des tissus différenciés de l'embryon [24, 26]. Des tumeurs en tous points identiques sont produites expérimentalement par implantation sous la capsule testiculaire, de crêtes génitales colonisées par les gonocytes (embryons de 12 jours) ou bien encore de blastocystes [26]. Certaines de ces tumeurs sont transplantables dans l'animal isogène : dans la cavité péritonéale, elles donnent naissance à une forme ascitique contenant des amas cellulaires morphologiquement voisins des blastocystes, les corps embryonnaires [26]. C'est par étalement *in vitro* de corps embryonnaires dans le milieu de culture approprié que l'on a établi des lignées de cellules primitives (PTC) qui ont conservé la capacité de donner naissance à des tissus différenciés dans l'animal [14, 16, 19, 21] ou même *in vitro* [16, 19].

Ces lignées PTC pourraient être considérées comme des proliférations de blastomères, et constitueraient alors un système modèle pour l'étude de la différenciation embryonnaire, pour peu que l'on puisse étayer davantage l'homologie entre ces cellules et celles d'une morula. De ce point de vue, l'approche immunologique s'est révélée pour l'instant la plus efficace.

LES ANTIGÈNES DE SURFACE DES CELLULES PTC

a) On a recherché la présence des antigènes majeurs de transplantation (H-2^b) sur les cellules PTC de la souris 129. Ces antigènes n'ont pu y être décelés, que ce soit par cytotoxicité directe ou par absorption [1]. Ceci est à rapprocher du fait que ces antigènes ne sont pas présents sur l'œuf, ni sur la morula [13, 20].

b) Un antisérum spécifique a été produit par immunisation de souris mâles syngéniques 129 avec des cellules PTC irradiées [3] (cette procédure élimine l'interférence : de l'antigène HY [11], de la différenciation *in vivo* et de la croissance des tumeurs). Cet antisérum reconnaît au moins un antigène sur la surface des cellules utilisées pour l'immunisation, que ce soit en test de cytotoxicité (100 p. 100 de cellules tuées, titre de 1/3 000), en immunofluorescence ou en marquage à la peroxydase (100 p. 100 de cellules marquées [3]). Du fait des conditions de l'immunisation, cet antigène est soit fœtal, soit tumoral, soit viral. En réalité, il semble bien qu'il s'agisse d'un antigène fœtal : en effet, on peut le déceler sur toutes les souches PTC y compris celles provenant d'un tératome ovarien (T), mais sur aucune des souches différenciées qui en dérive (endoderme, myocarde, fibroblaste) ; on ne le trouve pas non plus sur aucune autre tumeur murine, non plus que sur des cellules transformées par les virus S40 ou polyome [3]. Par contre, on trouve cet antigène exprimé sur la surface de l'embryon, et tout particulièrement sur la morula et le blastocyste ; l'œuf non fécondé et fécondé stade 1 cellule paraissent en être dépourvu [3]. Il s'agit donc là d'un antigène commun aux cellules PTC et à l'œuf de souris très précoce et qui semble associé à cet état embryonnaire.

IDENTIFICATION GÉNÉTIQUE DE L'ANTIGÈNE PTC

a) Il existe cependant un tissu de l'animal adulte qui possède le même matériel de surface : les tubes séminifères. En effet, une suspension de cellules testiculaires est capable d'absorber spécifiquement le sérum anti-PTC [3]. Il en est de même pour les spermatozoïdes isolés. Un grand nombre d'antigènes ont déjà été décelés sur la surface de cette cellule. L'absence de H-2^b sur les cellules PTC comme les conditions d'immunisation excluent qu'il s'agisse des antigènes H-2^b ou HY. Par contre, il pouvait s'agir d'un des antigènes codés par les allèles du locus *T*.

b) Le locus *T* de la souris apparaît comme un « groupe » de gènes défini par 6 groupes de « complémentation » dont chacun joue un rôle essentiel dans une étape précise du développement de l'embryon [6]. Une certaine mutation, t^{12} , à l'état homozygote, interdit la différenciation de la morula en blastocyste [23]. Par ailleurs, ces gènes codent chacun pour un antigène de surface décelé jusqu'à présent sur les seuls spermatozoïdes [29]. Enfin, chez un hétérozygote, par exemple $+/t^{12}$, il semble qu'il y ait expression identique des deux antigènes menant à une population de spermatozoïdes + et à une de spermatozoïdes t^{12} [30]. Une absorption quantitative d'une dilution fixe de sérum anti-PTC par des quantités croissantes de spermatozoïdes extraits de divers hétérozygotes pour les allèles de *T* a permis de constater qu'il fallait toujours deux fois plus de cellules d'un animal où t^{12} était engagé dans quelque combinaison que ce soit, que de celles d'un animal où il n'apparaît pas : l'antigène commun aux cellules PTC, à l'œuf et aux spermatozoïdes est donc très vraisemblablement codé par l'allèle sauvage de t^{12} [2].

De disposer d'un antiserum très puissant permettrait de répondre à certaines questions à propos du locus *T* et, par exemple, de déterminer la localisation de l'antigène sur les spermatozoïdes et son moment d'expression au cours de la spermatogénèse.

LOCALISATION DE L'ANTIGÈNE SUR LE SPERMATOZOÏDE

L'étude de la localisation d'un antigène sur le spermatozoïde en immunofluorescence indirecte se heurte à cette difficulté, que l'on trouve dans tout antiserum une population d'autoanticorps affines pour le spermatozoïde, population que l'on ne sait pas éliminer spécifiquement. Dans la mesure où des études préalables avaient montré que les cellules PTC ne fixaient pas les autoanticorps [9], on a pu comparer systématiquement les figures obtenues avec du sérum immun et du sérum immun absorbé massivement sur les cellules PTC. On peut alors montrer que 15 p. 100 des spermatozoïdes montrent un marquage spécifique de la zone postacrosomiale, alors que les autoanticorps sont plus particulièrement dirigés contre des déterminants localisés sur l'acrosome [9].

Cette localisation est particulièrement intéressante : ces membranes postacrosomiques sont en effet les seules à persister après capacitation [4] et l'ovocyte semble reconnaître le spermatozoïde fécondant à ce niveau [28] ; enfin, ces membranes se mélangent à celles de l'œuf après fécondation [28].

EXPRESSION DE L'ANTIGÈNE SUR LES CELLULES DE LA LIGNÉE GERMINALE MÂLE

Comme il a été dit plus haut, il est difficile de repérer les effets spécifiques des anticorps anti-PTC au milieu de ceux des autoanticorps. C'est pourquoi, de même que précédemment, on a recherché systématiquement les différences entre effets du sérum immun et effets du même sérum absorbé massivement sur cellules PTC. De plus, l'identification des types cellulaires sur frottis et coupes, sans coloration, est très délicate. Enfin, leur identification est rendue encore plus difficile par la nécessité de travailler sur des coupes faites au cryotome sans fixation préalable. On a cherché à tourner ces difficultés en étudiant la présence de l'antigène sur les cellules testiculaires de l'animal prépubère de 8-10 jours chez lequel la spermatogenèse est arrivée au stade spermatocyte I [18] et où les autoantigènes ne sont pas encore synthétisés, puis en vérifiant si possible ces résultats sur l'adulte.

Étude de l'animal prépubère

On sait que chez les animaux de 10 jours, les cellules de Sertoli sont en voie de maturation, que les gonocytes ont disparu, tandis que les spermatogonies ont colonisé l'espace péribasal [18]. En outre, près du centre du tube on trouve environ 40 p. 100 de spermatocytes I stade leptotène. Aucun stade ultérieur n'est décelable.

a) Une absorption quantitative de l'antisérum par des cellules dissociées (qui sur frottis sont identifiées à 95 p. 100 de spermatogonies et de spermatocytes I) montre que $5 \cdot 10^5$ cellules suffisent pour réduire l'activité de moitié, alors que $3 \cdot 10^6$ spermatozoïdes sont nécessaires. Une absorption complète de l'antisérum est obtenue avec $2 \cdot 10^6$ cellules.

b) Un examen des mêmes cellules isolées, par immunofluorescence indirecte montre que plus de 90 p. 100 des cellules sont marquées spécifiquement par le sérum anti PTC pour une dilution de 1 : 100 et que les autoantigènes ne sont pas décelables.

c) Des coupes au cryotome (8 μ) ont été examinées par immunofluorescence indirecte. Elles montrent un marquage spécifique membranaire de cellules que l'on peut identifier comme des spermatogonies et spermatocytes I, après marquage secondaire des noyaux au bromure d'éthydiu.

d) Les cellules de Sertoli restent difficiles à mettre en évidence dans ces conditions. De façon à nous assurer de leur non réactivité en immunofluorescence, nous avons étudié des coupes de testicule d'un animal homozygote pour le marqueur Steel [22]. Un tel animal est viable mais stérile du fait de l'absence totale de lignée germinale. Chez cet animal de 11 jours, les cellules de Sertoli étaient normalement différenciées et totalement dépourvues d'antigène PTC.

Étude de l'animal pubère

Chez l'animal pubère (6 semaines), tous les types cellulaires sont évidemment représentés. L'examen des coupes est compliqué par l'apparition des autoantigènes sur les spermatides et les spermatozoïdes. Cependant, on peut identifier un marquage

spécifique intense sur tous les stades diploïdes, confirmant le résultat obtenu sur l'animal impubère.

A titre de contrôle, l'épididyme du même animal ne montre aucune réaction positive, non plus que son foie.

CONCLUSIONS

La situation est assez étonnante d'un antigène de surface, dont la génétique et l'embryologie suggèrent qu'il joue un rôle essentiel à un moment précis du développement embryonnaire et qui se trouve cependant également exprimé sur d'autres surfaces cellulaires. Il faut donc lui supposer plusieurs rôles (et celui sur le spermatozoïde est rien moins que clair puisque tous les antigènes du locus *T* s'y trouvent exprimés [29]), soit lui supposer une fonction plus générale dans l'économie de l'embryon.

Par ailleurs, l'antigène commun aux cellules PTC, à l'œuf et au spermatozoïde est exprimé sur les états diploïdes des cellules germinales. Alors même que les travaux de YANAGISAWA [30] démontrent qu'il existe chez un mâle hétérozygote $+/t^{12}$ deux populations de spermatozoïdes, les uns $+$ et les autres t^{12} , nos résultats suggèrent que ce même antigène, dont on pensait qu'il serait synthétisé à un stade post-méiotique, est en réalité déjà exprimé sur les spermatogonies. Cette situation n'est pas sans rappeler celle des antigènes majeurs d'histocompatibilité qui sont exprimés à l'état haploïde sur le spermatozoïde [7, 8], mais dont on a pu montrer qu'ils se trouvaient présents sur la surface de cellules diploïdes, les spermatocytes I [27]. Il est possible de rendre compte de ce paradoxe par plusieurs hypothèses : soit, par exemple, que cet antigène connaisse une synthèse continue au long de la spermatogenèse, mais soit l'objet d'un métabolisme très actif ; soit encore qu'un mécanisme d'exclusion allélique mime une expression haploïde chez les stades diploïdes.

*Colloque D. G. R. S. T., Biologie de la Procréation,
Paris, 7-8 mars 1975.*

REMERCIEMENTS

Ce travail a pu être réalisé grâce à l'aide du Centre National de la Recherche Scientifique, de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, de la Fondation André MEYER et du National Institute of Health.

SUMMARY

MURINE TERATOCARCINOMA, T LOCUS AND GERMINAL CELL LINES

Several primitive teratocarcinoma (PTC) cell lines have been isolated from transplantable teratomas. These cell lines have retained the ability to differentiate *in vivo* into most of the embryonic tissues. Antisera against one of these cell lines have been raised in the syngeneic mouse (129/Sv). These antisera allowed the detection of a cell surface antigen, common to all PTC cell lines, mouse cleavage embryos and spermatozoa. This antigen could not be detected on other embryonic tissues or tumors. It appears to be characteristic of early stages of mammalian develop-

ment. Using the method of quantitative absorption, the PTC antigen has been shown as specified by the $+t^{12}$ allele of the *T* locus, a gene which plays a critical role in early mouse egg development.

The antigen was found located on the post acrosomal zone of mature spermatozoa. Developmental expression of the $+t^{12}$ antigen has been studied in the spermatogenic cell series, mostly by indirect immunofluorescence techniques. On frozen sections of juvenile testes, containing only spermatogonia and primary spermatocytes, the antigen was detected at the surface of the diploid precursors of spermatozoa. This result was confirmed by quantitative absorption of anti- $+t^{12}$ serum on these same cells, followed by cytotoxicity test on PTC cells. Furthermore, the antigen could not be detected on cells of juvenile testis of strain Steel/steel which lacks the germinal line. The same pattern of expression was also found in adult mouse testes, confirming the diploid expression of the antigen. These results are discussed from the view-point of their bearing on the established haploid expression of the $+t^{12}$ antigen on spermatozoa.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] ARTZT K., JACOB F., 1974. Absence of serologically detectable H-2 on primitive terato carcinoma cells in culture. *Transplantation*, **17**, 633-634.
- [2] ARTZT K., BENNETT D., JACOB F., 1974. Primitive teratocarcinoma cells express a differentiation antigen specified by a gene at the *T* locus in the mouse. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **71**, 811-814.
- [3] ARTZT K., DUBOIS P., BENNETT D., CONDAMINE H., BABINET C., JACOB F., 1973. Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **70**, 2988-2992.
- [4] BEDFORD S. M., 1968. Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit. *Amer. J. Anat.*, **123**, 329-341.
- [5] CHURCH R. B., SCHULTZ G. A., 1974. Differential gene activity in the pre- and post-implantation mammalian embryo. *Current topics in Developmental Biology*, **8**, 179-202.
- [6] DUNN L. C., BENNETT D., 1964. Abnormalities associated with a chromosome region in the mouse. *Science*, **144**, 260-267.
- [7] FELLOUS M., DEAUSSET J., 1970. Probable haploid expression of HL-A antigens in human spermatozoa. *Nature*, **225**, 191-193.
- [8] FELLOUS M., DEAUSSET J., 1971. Histocompatibility antigens on human spermatozoa. In *Immunology of reproduction*, 11d Intern. Congress. Varna, Bulgaria, p. 332-343.
- [9] FELLOUS M., GACHELIN G., BUC-CARON M. H., DUBOIS P., JACOB F., 1974. Similar location of an early embryonic antigen on mouse and human spermatozoa. *Dev. Biol.*, **41**, 331-337.
- [10] GARDNER R. L., 1972. An investigation of inner cell mass and trophoblast tissues following their isolation from mouse blastocyst. *J. Embryol. exp. Morph.*, **28**, 279-312.
- [11] GOLDBERG E. H., BOYSE E. A., BENNETT D., SCHEID M., CARSWELL E. A., 1971. Serological demonstration of HY (male) antigen on mouse sperm. *Nature*, **232**, 478-480.
- [12] HERBERT M. C., GRAHAM C. F., 1974. Cell determination and biochemical differentiation of the early mammalian embryo. *Current topics in Developmental Biology*, **8**, 151-178.
- [13] HEYNER S., 1973. Detection of H-2 antigens on the cells of the early mouse embryo. *Transplantation*, **16**, 675-678.
- [14] JAKOB H., BOON T., GAILLARD J., NICOLAS J. F., JACOB F., 1973. Tératocarcinome de la Souris : isolement, culture et propriétés de cellules à potentialités multiples. *Ann. Microb. (Inst. Pasteur)*, **124 B**, 269-282.
- [15] KAHAN B. W., EHRUSSI B., 1970. Developmental potentialities of clonal *in vitro* cultures of mouse testicular teratoma. *J. Nat. Cancer Inst.*, **44**, 1015-1029.
- [16] LEHMANN J.-M., SPEERS W. C., SWARTZENDRUBER D. E., PIERCE G. P., 1974. Neoplastic differentiation : characteristics of cell lines derived from a murine teratocarcinoma. *J. Cell. Physiol.*, **84**, 13-28.
- [17] MINTZ B., 1974. Gene control of mammalian differentiation. *Ann. Review of Genetics*, **8**, 411-470.
- [18] NEBEL B. R., AMAROSE A. P., HACKETT E. M., 1961. Calendar of gametogenic development in the prepuberal male mouse. *Science*, **134**, 832-833.
- [19] NICOLAS J. F., DUBOIS P., JAKOB H., GAILLARD J., JACOB F., 1975. Tératocarcinome de la Souris : différenciation en culture de cellules primitives à potentialités multiples. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **126 A**, 1-20.
- [20] PALM J., HEYNER S., BRINSTER R. L., 1971. Differential immunofluorescence of fertilized mouse eggs with H-2 and non H-2 antibodies. *J. exp. Med.*, **133**, 1282-1293.
- [21] ROSENTHAL M. D., WISHNOW R. M., SATO G. H., 1970. *In vitro* growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma. *J. Nat. Canc. Inst.*, **44**, 1001-1009.

- [22] SARVELLA P. A., RUSSELL L. B., 1956. Steel : a new dominant gene in the house mouse. *J. Heredity*, **47**, 123-128.
- [23] SMITH L. J., 1956. A morphological and histochemical investigation of a preimplantation lethal mutant (t^{12}) in the house mouse. *J. Exptl. Zool.*, **132**, 51-79.
- [24] STEVENS L. C., 1962. Testicular teratomas in fetal mice. *J. Nat. Cancer Inst.*, **28**, 247-268.
- [25] STEVENS L. C., 1964. Experimental production of testicular teratomas in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **52**, 654-661.
- [26] STEVENS L. C., 1970. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos. *Develop. Biol.*, **21**, 364-382.
- [27] VOJTIŠKOVÁ M., POKORNÁ Z., 1972. Developmental expression of H-2 antigens in the spermatogenic cell series : possible bearing on haploid gene action. *Folia Biologica (Prague)*, **18**, 1-9.
- [28] YANAGIMACHI R., NICOLSON G. L., NODA Y. D., FUJIMOTO M., 1973. Electron microscopic observations of the distribution of acidic anionic residues on hamster spermatozoa and eggs, before and during fertilization. *J. Ultrastr. Res.*, **43**, 344-353.
- [29] YANAGISAWA K., BENNETT D., BOYSE E. A., DUNN L. C., DIMEO A., 1974. Serological identification of sperm antigens specified by lethal t-alleles in the mouse. *Immunogenetics*, **1**, 68-74.
- [30] YANAGISAWA K., POLLARD D. R., BENNETT D., DUNN L. C., BOYSE E. A., 1974. Transmission ratio distortion at the T locus : serological identification of two sperm populations in t-heterozygotes. *Immunogenetics*, **1**, 57-67.