



HAL
open science

Une stratégie pour immortaliser des lignées orientées vers l'endoderme, le neuroectoderme ou le mésoderme à partir du tératocarcinome de la souris

Mh Buc-Caron, Jm Launay, Pj Marie, O Kellermann

► To cite this version:

Mh Buc-Caron, Jm Launay, Pj Marie, O Kellermann. Une stratégie pour immortaliser des lignées orientées vers l'endoderme, le neuroectoderme ou le mésoderme à partir du tératocarcinome de la souris. *Reproduction Nutrition Development*, 1990, 30 (3), pp.309-316. hal-00899260

HAL Id: hal-00899260

<https://hal.science/hal-00899260>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Une stratégie pour immortaliser des lignées orientées vers l'endoderme, le neuroectoderme ou le mésoderme à partir du tératocarcinome de la souris

MH Buc-Caron ^{1*}, JM Launay ², PJ Marie ³, O Kellermann ¹

¹ Institut Pasteur, 25, rue du docteur Roux, 75724 Paris;

² Hôpital St-Louis, 1, avenue C Vellefaux, 75010 Paris;

³ Hôpital Lariboisière, 2, rue Ambroise, 75475 Paris cedex 10, France

(15^e réunion du groupe Développement INRA, Paris, 24–26 mai 1989)

Résumé — Afin d'immortaliser des cellules fixées à des stades précoces de l'embryogenèse, des plasmides contenant la région précoce de SV40 ont été introduits dans les carcinomes embryonnaires (EC) F9 et 1003. Seule la construction PK4 dans laquelle les oncogènes de SV40 sont placés sous le contrôle du promoteur E1A de l'adénovirus 5, a permis l'expression des oncogènes de SV40 au cours des premiers stades de la différenciation des EC. Des clones correspondant à des précurseurs des lignages neuroectodermique, mésodermique ou endodermique ont alors été sélectionnés avec une fréquence élevée, selon les critères suivants: sélection de cellules immatures :

- ayant perdu les marqueurs des EC,
- ayant un phénotype stable,
- immortalisées par l'expression des oncogènes de SV40,
- capables de différencier *in vivo* ou *in vitro* le long d'un seul lignage.

La description de clones correspondant à des précurseurs des différents lignages de l'embryon est donnée à titre d'exemple.

tératocarcinome / oncogène / immortalisation / détermination / différenciation

Summary — A strategy to immortalize, from mouse teratocarcinomas, cell lines committed to endoderm, neuroectoderm or mesoderm. With the aim of immortalizing embryonic cells fixed at early embryonic stages, various plasmids carrying the SV40 early region were introduced into the mouse embryonal carcinomas (EC) F9 and 1003. Only the construction PK4, in which the SV40 oncogenes are placed under the control of the adenovirus E1A promoter, led to the immortalization of the cells at the onset of differentiation. Clones corresponding to committed precursors of each embryonic lineage (neuroectoderm, mesoderm and endoderm) were then selected with high efficiency according to the following strategy: selection of immature cells which:

- have lost EC cell markers,
- keep a stable phenotype,
- are immortalized by the expression of the SV40 oncogenes and are still able to differentiate along a restricted lineage *in vitro* or *in vivo*.

Examples of an endodermal precursor (H7) which differentiates into extraembryonic and embryonic endoderm, of a neuroectodermic clone (IC11) committed to a serotonergic differentiation, and of a mesodermal osteogenic clone (C1) which gives rise to bone *in vivo* and *in vitro*, are given.

teratocarcinoma / oncogene / immortalisation / détermination / différenciation

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

De nombreuses lignées de cellules multipotentielles ont été établies *in vitro* à partir de tératocarcinomes (carcinome embryonnaire, EC) (Jakob et Nicolas, 1987) ou directement à partir d'embryons (embryonal stem cell, ES) (Evans et Kaufman, 1981). Ces lignées sont capables *in vivo* et/ou *in vitro* de différencier en dérivés des 3 feuilletts embryonnaires : neuroectoderme, mésoderme, endoderme.

Mais au cours de leur différenciation, les EC ou les cellules d'embryon perdent la capacité de se diviser et seulement quelques lignées permettant principalement d'étudier des mécanismes de différenciation terminale ont pu être établies à partir des tératocarcinomes (Nicolas *et al*, 1976). Les expériences de mutagenèse (Boon *et al*, 1975) ou de transformation virale (Knowles *et al*, 1980) visant à isoler, à partir des EC multipotentielles ou à partir d'embryons, des cellules souches restreintes dans leurs potentialités à un seul lignage de l'embryon, se sont avérées négatives. Notre objectif fut donc de construire des plasmides susceptibles de faire exprimer des oncogènes dans les premiers stades de la différenciation cellulaire afin d'immortaliser *in vitro* des cellules souches «déterminées» vers 1 des 3 feuilletts embryonnaires. Une cellule déterminée est une cellule engagée dans une voie de différenciation, qui n'exprime pas encore les marqueurs des cellules différenciées, et qui est capable de différencier plus avant sous l'effet d'inducteurs spécifiques. De telles lignées, issues du tératocarcinome ou de l'embryon permettraient d'analyser les événements impliqués dans les mécanismes de détermination et de différenciation cellulaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture et différenciation des cellules

Les cellules sont cultivées sur des boîtes traitées pour la culture de tissu dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 10% de sérum foetal de veau (FBS). Les clones ont été obtenus par dilution limite (0,3 cellule par puits). Pour induire leur différenciation, les cellules 1C11 (2×10^3 cellules par cm^3) sontensemencées en présence de 10^{-3} mol/l dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) et de 0,05% acide carboxylique cyclohexane (CCA). Pour induire la minéralisation *in vitro*, les cellules C₁ sont cultivées en agrégats sur des boîtes de Petri non traitées pour la culture. Après 5-8 j, les agrégats sont induits à différencier en présence de 1% FBS, d'acide ascorbique (50 $\mu\text{g/ml}$) et de β -glycérophosphate (7 mmol/l). Les nodules calcifiés apparaissent rapidement (2 j) à partir des agrégats.

Immunocytochimie

Les marqueurs spécifiques ont été détectés par immunofluorescence indirecte en utilisant plusieurs antisérums : l'anticorps monoclonal PAB419 détectant l'antigène T de SV40, les anticorps anti-LCAM et NCAM, antifibronectine et anticytokératine endo A (Kellermann *et al*, 1987), les anticorps monoclonaux de rat : SY38 antisynaptophysine (Dr Wiedenmann, Heidelberg, RFA), YC5/45 antisérotinine (Dr Milstein, Cambridge, UK) l'anticorps de lapin anti Met-enképhaline (Dr Cesselin, Paris). Des seconds anticorps purifiés par affinité, couplés à la Rhodamine, ont permis de visualiser les sites de fixation du premier anticorps. Des contrôles négatifs sans le premier anticorps ont été effectués dans toutes les expériences.

Métabolisme de la sérotonine

La biosynthèse de sérotonine a été mesurée à partir du tryptophane par radiochromatographie

et par dosage radioenzymatique. Les paramètres de la capture de sérotonine sont mesurés à 37 °C après lavage des cellules dans un milieu sans sérum. La capture a été inhibée par les drogues suivantes: clomipramine (10^{-8} mol/l), R04-1284 (10^{-5} mol/l); paroxétine (10^{-8} mol/l); ouabaïne (10^{-4} mol/l).

Identification histochimique de la phosphatase alcaline

Les coupes de nodules calcifiés (5 μ m d'épaisseur) sont fixés à 4 °C dans l'éthanol 95%, exposées au naphthol ASBI phosphate (30 min, 37 °C, pH 8,6) et observées après contrecoloration par l'hématoxyline.

RÉSULTATS

Construction de plasmides recombinants adéno-SV40

L'expression d'un gène viral dépend des fonctions cellulaires de l'hôte. Les cellules multipotentielles de l'embryon ou les cellules EC sont résistantes à l'infection par de nombreux virus comme polyome, SV40 ou les rétrovirus. SV40 ne s'exprime pas avant le 9^e ou le 10^e jour de l'embryogénèse de la souris et, *in vitro*, seules les cellules différenciées permettent l'expression virale et sont alors transformées. En revanche, l'adénovirus s'exprime aussi bien dans les cellules EC que dans les cellules différenciées (Kelly et Condamine, 1982).

Nous avons donc décidé de faire appel aux régions promotrices activatrices de l'adénovirus pour faire exprimer la région précoce du virus SV40 dans les cellules embryonnaires précoces. Un plasmide, PK4, a été construit avec la région précoce de SV40 en aval de la séquence promotrice activatrice du gène E1A de l'adénovirus de type 5. Des plasmides dérivés de

PK4 portant la région activatrice de SV40, soit à l'intérieur du promoteur E1A, soit en aval de la région précoce de SV40, ont également été fabriqués (fig 1).

Expression de PK4 dans les cellules de carcinome embryonnaire

Des lignées EC, F9 (Bernstine *et al*, 1973) et 1003 (McBurney, 1976), ayant intégré le plasmide PK4, ont été obtenues par co-transfection de ce plasmide avec le plas-

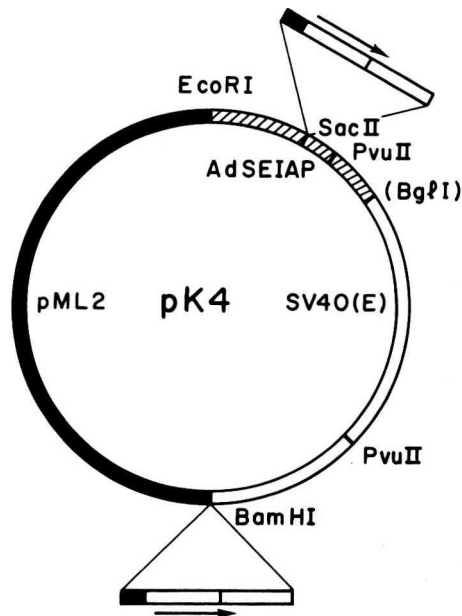


Fig 1. Plasmides PK4 et dérivés. PK4 contient la région précoce de SV40 (blanc) liée à la région promotrice activatrice de l'adénovirus 5 (hachurée) dans le vecteur PML2 (noir) (Kellermann et Kelly, 1986). Les dérivés PK4^S et PK4^B contiennent la région activatrice de SV40 insérée, respectivement, au site *SacII* du promoteur E1A (nucléotide 360) et au site *BamHI* (à la liaison SV40/PML2). La région activatrice de SV40 contient la répétition des 72 paires de bases (nucléotides 128-270) de SV40 (blanc) et une région adjacente (nucléotides 115-128) (noir).

mide PSVtkneof et sélection des clones résistants au G418. La permissivité de ces 2 lignées vis-à-vis de l'expression de PK4 s'est révélée très différente. Le promoteur E1A de l'adénovirus permet une expression des fonctions précoces de SV40 dans les clones 1003 PK4 à l'état EC. L'expression de l'antigène T de SV40 révélée par immunofluorescence indirecte n'est donc pas létale pour les cellules EC, n'induit pas leur différenciation et n'empêche pas les cellules 1003-PK4 de différencier, après induction *in vitro* ou *in vivo*, en dérivés des 3 feuilletts embryonnaires.

En revanche, le promoteur E1A de l'adénovirus n'est pas suffisant pour permettre une expression de l'antigène T de SV40 dans les clones F9 transformés. Cette restriction n'est levée, ni par une augmentation du nombre de copies intégrées, ni par l'adjonction de l'activateur de SV40 dans le plasmide PK4 en amont ou en aval des gènes précoces de SV40 (tableau I). Par contre l'induction de la différenciation des clones F9PK4 par l'acide rétinolique (AR) et le dibutyryl AMPc (dbAMPc) s'accompagne d'une expression de l'antigène T de SV40 (Kellermann et Kelly, 1986).

Stratégie pour sélectionner des clones précurseurs des lignages cellulaires à partir des clones F9 K4b2 et 1003 PK4

L'induction de la différenciation des lignées EC ayant intégré dans leur génome PK4 (F9 K4B2, 1003-PK4) conduit à l'obtention d'une population immortalisée tumorigène exprimant l'antigène T de SV40. Cette population contient à la fois des dérivés du neuroectoderme, du mésoderme et de l'endoderme ainsi que des cellules immatures. Supposant que les cellules immatures situées au voisinage de cellules différenciées pouvaient correspondre aux précurseurs recherchés, nous avons sélectionné, puis cloné les précurseurs potentiels sur la base des critères suivants :

- perte des marqueurs des EC, absence de réversion vers l'état EC;
- expression de l'antigène T de SV40 et immortalisation;
- phénotype stable à l'état de précurseur et différenciation reproductible vers un seul lignage.

L'expression de l'antigène T de SV40 nous a permis d'obtenir des clones avec une fréquence élevée (efficacité de clo-

Tableau I. Expression de l'antigène T de SV40 dans les lignées EC transformées par PK1 (Gluzman et Ahrens, 1982), PK4 et ses dérivés. * Le nombre de plasmides intégrés selon les clones a été estimé par comparaison avec la lignée SVT2. ** L'antigène T de SV40 s'exprime après induction de la différenciation.

	Promoteur	Activateur de SV40	Copies intégrées *	Clones EC expriment T nombre de clones transformés
F9PK1	SV40	+	2 à 5	0/3
F9PK4 ^S	E1a	+	2 à 5	0/5
F9PK4 ^B	E1a	+	2 à 5	0/3
F9PK4	E1a	-	2 à 50	0/5**
1003 PK4	E1a	-	1 à 3	3/3

nage > 80%). En revanche, la sélection de lignées de précurseurs s'est révélée particulièrement difficile du fait de l'absence de marqueurs connus spécifiques des étapes précoces de l'embryogénèse. L'identité des clones n'a pu être établie qu'après induction, grâce à l'éventail des différenciations obtenues (fig 2). Nous disposons maintenant de clones représentatifs de cellules souches de différentes voies de différenciation (Kellermann *et al*, 1987).

Caractérisation de clones précurseurs des voies endodermique, neuroectodermique ou mésodermique

Tous les clones immortalisés expriment l'antigène T de SV40, présentent un phénotype stable à l'état de précurseur et sont capables de se différencier *in vitro* et/ou *in vivo* selon un programme cohérent et reproductible. A titre d'exemple, voici les propriétés de 3 de ces clones.

Précurseurs endodermiques

Le clone F9 K4b2 a été induit à se différencier en agrégats en présence d'AR et de dbcAMP. Les cellules qui se différencient à la périphérie des agrégats expriment l'antigène T de SV40. Elles ont le phénotype des cellules extra-embryonnaires d'endoderme viscéral, elles synthétisent l' α -foetoprotéine (Hogan *et al*, 1981) et la villine (Buc-Caron *et al*, 1989). Des clones endodermiques immortalisés ont été sélectionnés après remise en culture des cellules bordant les agrégats. *In vitro*, le clone H7 se différencie en cellules d'endoderme viscéral. *In vivo*, H7 a les propriétés d'un précurseur endodermique multipotentiel. Les tumeurs induites par l'injection du clone H7 à des souris syngéniques sont constituées d'un mélange de dérivés endodermiques extra-embryonnaires (endoderme pariétal et viscéral) et embryonnaires (épithélium intestinal avec des cellules à mucus) (Kellermann *et al*, 1987).

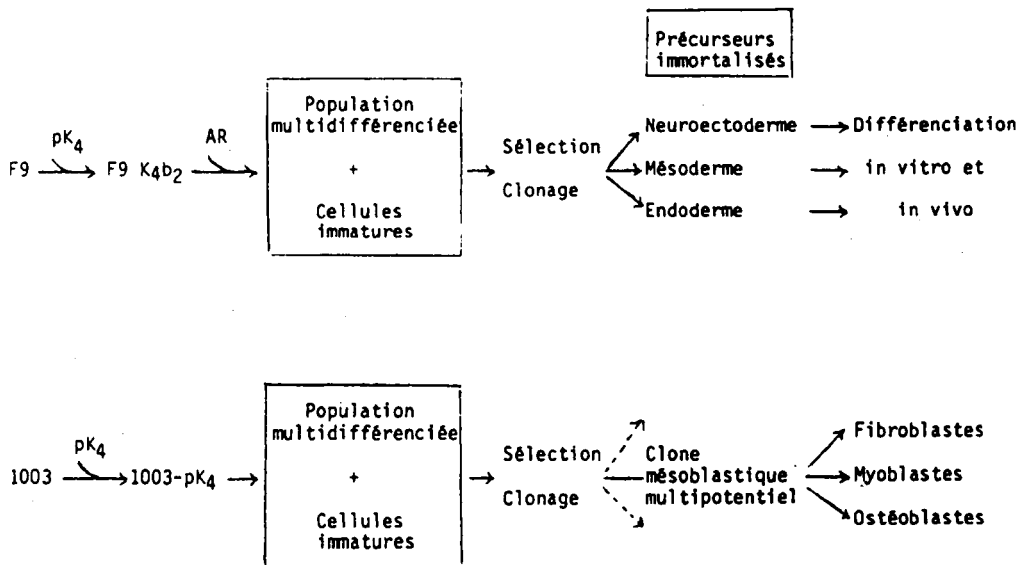
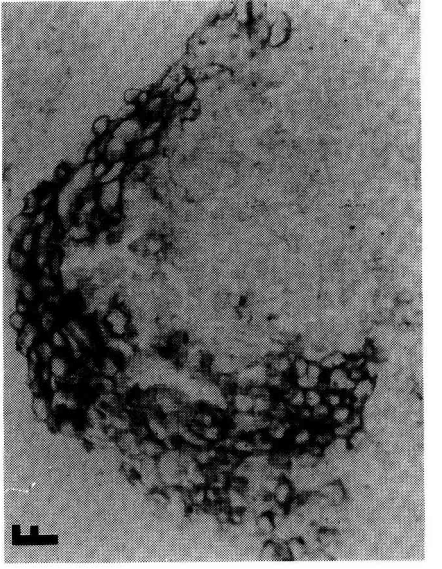
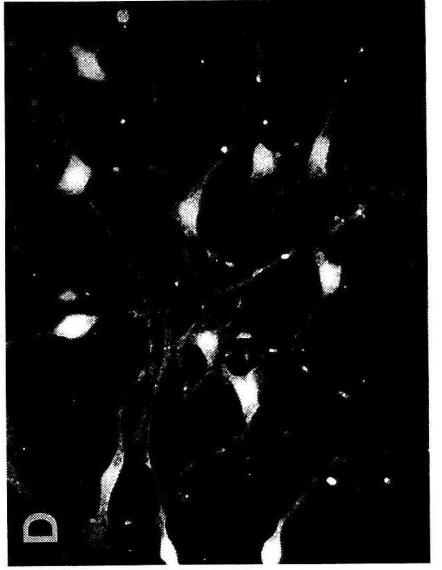
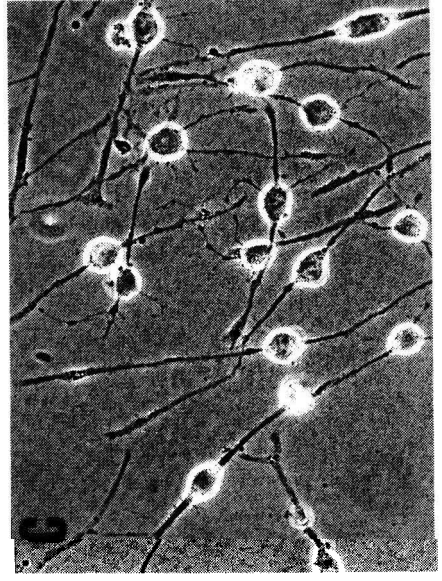
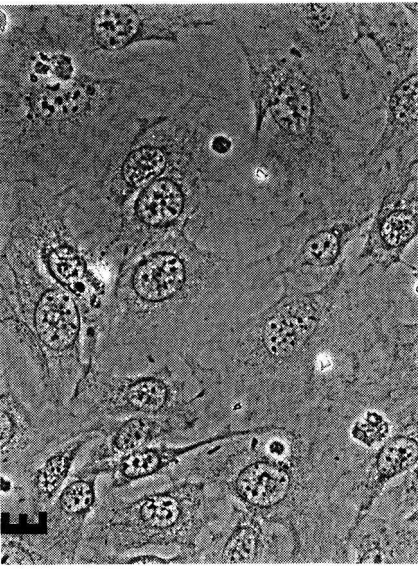
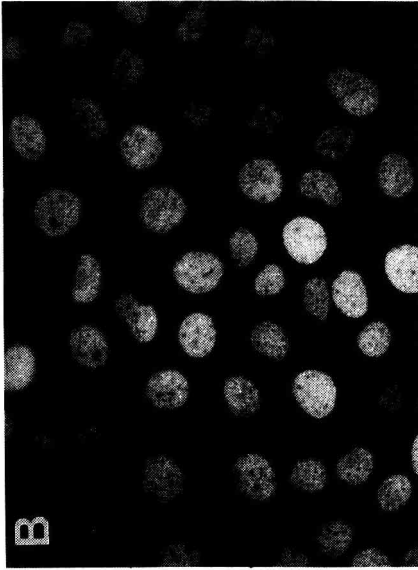
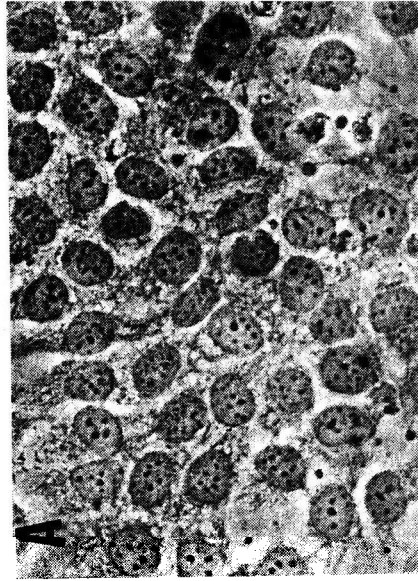


Fig 2. Représentation schématique du mode d'obtention et de sélection des précurseurs de lignages.



Précurseur neuroectodermique

En absence d'inducteur, les cellules ICII ont un phénotype épithélial (fig 3A) expriment la cytokératine endo A et la protéine d'adhésion L CAM. En présence de dbAMPc, plus de 95% des cellules (ICII*) développent des extensions bipolaires (fig 3C) et continuent de se diviser et d'exprimer l'antigène T de SV40. Elles expriment la protéine d'adhésion NCAM, la fibronectine, la synaptophysine (marqueur des vésicules synaptiques) et la Met-enképhaline. Par des dosages immunochimiques et radioenzymatiques, nous avons montré que ces cellules ICII* synthétisent, stockent (fig 3D) et captent un neuromédiateur, la sérotonine. La capture de sérotonine par ICII est abolie par des drogues qui inhibent son transport membranaire et granulaire dans les neurones sérotoninergiques.

Les cellules présentent donc 2 états très homogènes: l'état de précurseur ICII et l'état différencié ICII* de phénotype neuronal ou neuroendocrinien sérotoninergique (Buc-Caron *et al*, 1990).

Précurseur ostéogénique

Le clone C₁ a été sélectionné parmi d'autres clones mésoblastiques car il exprime des phosphatases alcalines de type osseux. Les cellules C₁ expriment l'antigène T de SV40 et présentent un phénotype stable en absence d'inducteur (fig 3E). *In vivo*, les tumeurs induites par l'injection du clone C₁ sont des ostéosar-

comes. *In vitro*, en présence de β glycérophosphate et d'acide ascorbique, C₁ forme des nodules calcifiés (fig 3F). Les clichés de microscopie électronique confirment la minéralisation sur les fibres de collagène.

C₁ est donc un clone mésoblastique ostéogénique, capable de former de l'os *in vitro* et *in vivo* (Kellermann *et al*, 1990).

CONCLUSION

Le promoteur E1A de l'adénovirus permet l'expression des oncogènes de SV40 au cours des premiers stades de la différenciation des cellules EC. Ceci nous a permis d'immortaliser, de cloner, et de sélectionner des lignées correspondant à des cellules souches orientées vers les voies neuroectodermique, mésodermique et endodermique. Ces clones immortalisés sont des outils cellulaires permettant d'étudier les mécanismes de régulation génétique et épigénétique des cellules embryonnaires précoces.

RÉFÉRENCES

- Bernstine EG, Hooper ML, Grandchamp S, Ephrussi B (1973) Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 3899-3903
- Boon T, Kellermann O, Mathy E, Gaillard JA (1975) Mutagenized clones of a pluripotent teratoma cell line: variants with decreased differentiation or tumor formation ability. *In: Teratoma and Differentiation*. Academic Press, New York, 161-166

Fig 3. Cellules ICII : (A) phase, (B) Marquage nucléaire de l'antigène T de SV40 par immunofluorescence indirecte. Fixation méthanol. Cellules ICII* : (C) phase, (D) Marquage par des anticorps antisérotonine. Fixation paraformaldéhyde 3% puis éthanol 70%. Cellules C₁ : (E) phase d'une culture exponentielle (F) Marquage sur coupe par des anticorps antiphosphatase alcaline d'un agrégat calcifié.

- Buc-Caron MH, Lamblin D, Kellermann O (1989) Fg teratocarcinoma aggregates express villin upon differentiation into visceral endoderm-like cells. *Bio Cell* 65, 195-198
- Buc-Caron MH, Launay JM, Lamblin D, Kellermann O (1990) Serotonin uptake, storage and synthesis in an immortalized committed cell line derived from mouse teratocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1922-1926
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156
- Gluzman Y, Ahrens N (1982) SV40 early mutants that are defective for viral synthesis but competent for transformation of cultured rat and Simian cells. *Virology* 123, 78-92
- Hogan BLM, Taylor A, Adamson E (1981) Cell interactions modulate embryonal carcinoma cell differentiation into parietal or visceral endoderm. *Nature* 291, 235-237
- Jakob H, Nicolas JF (1987) Mouse teratocarcinoma cells. In: *Methods in Enzymology* 151, 66-81
- Kellermann O, Kelly F (1986) 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
- Kellermann O, Buc-Caron MH, Gaillard J (1987) Immortalization of precursors of endodermal, neuroectodermal and mesodermal lineages, following the introduction of the simian virus (SV40) early region into F9 cells. *Differentiation* 35, 197-205
- Kellermann O, Buc-Caron MH, Maris PJ, Lamblin D, Jacob F (1990) An immortalized osteogenic cell line derived from mouse teratocarcinoma is able to mineralize *in vivo* and *in vitro*. *J Cell Biol* 110, 123-132
- Kelly F, Condamine H (1982) Tumor viruses and early mouse embryos. *Biochim Biophys Acta* 651, 105-141
- Knowles BB, Pan S, Solter D, Linnenbach A, Croce C, Huebner K (1980) Expression of H-2 laminin and SV40 T and TASA on differentiation of transformed murine teratocarcinoma cells. *Nature* 288, 615-618
- McBurney M (1976) Clonal lines of teratocarcinoma cells *in vitro*: differentiation and cytogenetic characteristics. *J Cell Physiol* 89, 441-456
- Nicolas JF, Avner P, Gaillard J, Guenet JL, Jakob H, Jacob F (1976) Cell lines derived from teratocarcinomas. *Cancer Res* 36, 4224-4231