

## INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.** Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps. Each original is also photographed in one exposure and is included in reduced form at the back of the book.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

# UMI

A Bell & Howell Information Company  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor MI 48106-1346 USA  
313/761-4700 800/521-0600



## **NOTE TO USERS**

**The original manuscript received by UMI contains pages with indistinct print. Pages were microfilmed as received.**

**This reproduction is the best copy available**

**UMI**



**ABLATION GÉNIQUE DE *bgp1* CHEZ LA SOURIS**

par Stéphanie Létourneau

Cette thèse est soumise à la Faculté des Études Graduées et de la Recherche pour satisfaire partiellement les conditions à l'obtention d'un diplôme de Maîtrise en Sciences.

© Stéphanie Létourneau

Janvier 1997

Département de Biochimie  
Université McGill, Montréal, Québec, Canada.



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-29740-3

Canada

## RÉSUMÉ

La glycoprotéine biliaire (BGP) fait partie de la famille des antigènes carcinoembryonnaires, elle-même incluse dans la superfamille des immunoglobulines (Ig). BGP est régulée à la baisse dans plusieurs types de carcinomes. L'équivalent chez la souris du BGP humain est Bgp1. C'est une protéine membranaire qui est exprimée dans un grand nombre de cellules épithéliales et endothéliales ainsi que dans plusieurs cellules du système immunitaire. Bgp1 est une molécule d'adhérence intercellulaire et peut agir comme suppresseur de tumeur. Ses fonctions physiologiques demeurent toutefois imprécises. Les études histoimmunochimiques de son mode d'expression durant le développement embryonnaire de la souris présentées dans ce mémoire suggèrent que cette protéine joue un rôle dans la différenciation des cellules épithéliales, dans la morphogénèse du tractus digestif, dans les processus embryonnaires de sécrétion/réabsorption, dans la myogénèse et dans les interactions épithélio-mésenchymateuses. Nous avons tenté de produire des cellules de souche embryonnaire de souris *bgp1 +/-*, qui serviraient ultimement à générer des souris *bgp1 -/-*, dans le but de clarifier le rôle physiologique de Bgp1. Les résultats des études sur l'expression de cette protéine durant le développement embryonnaire sont très utiles pour établir des stratégies d'analyse des souris mutantes lorsque celles-ci seront disponibles.

## ABSTRACT

The biliary glycoprotein (BGP) is a member of the carcinoembryonic antigen (CEA) family, a subgroup of the immunoglobulin superfamily. BGP is down-regulated in many carcinomas. The mouse homolog of human BGP is Bgp1. It is a membrane-bound protein expressed in many types of epithelial and endothelial cells as well as in cells of the immune system. It functions *in vitro* as a cell adhesion molecule and can act as a tumor suppressor. However, its physiological functions remain unclear. Histoimmunochemical studies of its expression pattern during development suggest that Bgp1 is active in epithelial differentiation, gut morphogenesis, absorption/reabsorption processes, myogenesis and mesenchymal-epithelial interactions. In order to test further the physiological functions of this protein, we have attempted to produce *bgp1* +/- mouse embryonic stem cells, which would have later been used to generate *bgp1* -/- mice. The results from the developmental studies will be extremely useful in the analysis of the *bgp1* -/- mice phenotype, when these mice become available.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	ix
REMERCIEMENTS.....	xiii
PRÉFACE.....	xiv

### **CHAPITRE 1: INTRODUCTION**

#### **Rôles des Antigènes Carcinoembryonnaires dans l'Initiation et la Progression**

##### **Tumorales**

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Introduction.....	3
Antigène Carcinoembryonnaire (CEA).....	5
Glycoprotéine Biliaire (BGP).....	10
Glycoprotéines Spécifiques à la Grossesse (PSG).....	14
Conclusion.....	15
Remerciements.....	16
Références.....	16
Légendes des Figures.....	22

Figures.....	24
--------------	----

## **CHAPITRE 2**

### **Biliary Glycoprotein 1 Expression During Embryogenesis: Correlation With Events of Epithelial Differentiation, Mesenchymal-Epithelial Interactions, Absorption and Myogenesis**

Abstract.....	30
Introduction.....	30
Materials and Methods.....	31
Mouse Embryos and Tissues.....	31
RNA Preparation and Northern Analyses.....	31
RT-PCR.....	31
Southern Analyses.....	31
Construction and Expression of Bgpl cDNA Mutants.....	32
Antibodies and Immunoblot Analyses.....	32
Cytofluorometric Analyses.....	32
Immunostaining.....	32
In Situ Hybridization.....	34
Results.....	34
Expression of Bgpl mRNAs During Embryonic Development....	34
Antibody Characteristics and Specificity.....	35
Immunocytochemical localization in Embryos and Fetuses.....	36

Earliest Bgp1 Protein Expression in the Conceptus.....	36
Early Expression of Bgp1 by Embryonic Surface Ectoderm.....	36
Bgp1 Expression in the Gut Endodermal Epithelium.....	38
CC1 Monoclonal Antibody Reacts With Developing Mesenchymal Tissues During a Period of Mesenchymal-Epithelial Interactions.....	38
AgB10 Monoclonal Antibody Stains Specific Embryo Organs.....	38
CC1 Monoclonal Antibody Epitope is Expressed at Sites of Active Myogenesis.....	38
Discussion.....	38
Bgp1 May Play a Role During the Critical Phase of Embryo Implantation.....	40
Bgp1 is Expressed During Early Morphogenesis of the Surface Ectoderm.....	41
Bgp1 May Be Involved in Secretion/Reabsorption Throughout Development.....	42
Bgp1 Is Expressed in Early Gut Development as well as Mesodermal Differentiative Activities.....	45
Bgp1 Is Expressed During Secondary Myotube Formation In Vivo.	46
Acknowledgments.....	47
References.....	47
Copies Originale des Figures .....	49

## CHAPITRE 3

### Génération de Cellules de Souche Embryonnaire de Souris *bgp1 +/-*

Préface.....	56
Introduction.....	57
Matériels et Méthodes.....	62
Analyses Southern.....	62
Sondes Marquées Radioactivement avec du $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP.....	62
Analyse Northern.....	63
Immunodétections.....	63
Préparation d'ADNc par Polymérisation en Chaîne (RT-PCR).....	64
Autres Réactions de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	64
Séquençage de l'ADN.....	66
Liste des Oligonucléotides.....	67
Criblage de la Banque Génomique.....	68
Préparation d'ADN de Phages.....	69
Construction du Vecteur de Ciblage.....	70
Transfection des Cellules de Souche Embryonnaire et	
Sélection des Recombinants.....	71
Préparation des Cellules Nourricières.....	72
Résultats.....	74
Caractérisation Génomique de <i>bgp1</i> chez les Souris 129Sv/J.....	74

Expression de l'ARNm de <i>hgp1</i> chez les Souris 129Sv/J.....	75
Expression de la Protéine Bgp1 chez les Souris 129Sv/J.....	76
Isolement et Caractérisation du Gène <i>hgp1</i> des souris 129Sv/J.....	77
Conception du Vecteur de Ciblage.....	79
Génération des Cellules de Souche Embryonnaire <i>hgp1</i> +/-.....	80
Discussion.....	82
Les Gènes <i>hgp1</i> et <i>hgp2</i> chez les Souris de Souche 129Sv/J.....	83
Criblage de la Banque Génomique.....	84
Génération des Cellules de Souche Embryonnaire <i>hgp1</i> +/-.....	85
Conclusion.....	86
Tableaux et Figures.....	87
Tableau 1: Résultats du Criblage de la Deuxième	
Banque Génomique.....	87
Tableau 2: Résultats des Électroporations de Cellules ES.....	88
Figure 1: Description des Sondes.....	89
Figure 2: Construction du Vecteur de Ciblage.....	90
Figure 3: Mode de Restriction des Gènes <i>hgp</i> .....	91
Figure 4: Expression de l'ARNm de <i>hgp1</i> .....	92
Figure 5: Expression de la Protéine Bgp1.....	93
Figure 6: <i>hgp1</i> chez les Souris 129Sv/J.....	94
Figure 7: Stratégie de Ciblage.....	95
Figure 8: Analyse des Clones Recombinants.....	96

Figure 9: Expression de Bgp1 dans les Cellules ES.....	97
Références.....	98

## CHAPITRE 4: DISCUSSION ET CONCLUSION

Introduction.....	103
Phénotype Létal.....	104
Implantation.....	105
Membranes Extra-Embryonnaires.....	109
Malformations Non-Létales.....	112
Tractus Digestif.....	112
Foie.....	115
Reins.....	118
Épiderme.....	118
Tissu Musculaire.....	119
Mésenchyme.....	120
Système Immunitaire.....	121
Absence de Phénotype Évident.....	123
Tumorigénèse.....	123
Résistance au MHV.....	124
Compensation Fonctionnelle de Bgp2.....	125
Références.....	127

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
APC	"adenomatous polyposis coli"
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
BGP	glycoprotéine biliaire humaine
<i>BGP</i>	gène de la glycoprotéine biliaire humaine
Bgp1	homologue chez la souris de BGP
<i>bgp1</i>	gène de Bgp1
Bgp2	autre glycoprotéine biliaire de la souris
<i>bgp2</i>	gène de Bgp2
<i>c-cam</i>	gène de la protéine "cell-cell adhesion molecule", homologue chez le rat de <i>bgp1</i>
C <sub>2</sub> -set Ig domain	domaine constant des Ig
C-terminal	carboxy-terminal
cDNA	"complementary DNA"
CEA	antigène carcinoembryonnaire
<i>CEA</i>	gène de CEA
<i>cea10</i>	autre gène apparenté aux <i>bgp</i> chez la souris

CGM7	"CEA gene family member-7"
cyt	cytoplasmique
DAB	"3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride"
DEPC	"diethylpyrocarbonate"
DNA	"deoxyribonucleic acid"
domaine A ou B	domaine semblable aux domaines constants des Ig
<i>dpc</i>	"days <i>post-coitum</i> "
EGF	"epidermal growth factor"
EGFR	"epidermal growth factor receptor"
FBS	"fetal bovine serum"
<i>Fgf-4</i>	gène du "fibroblast growth factor-4"
G3PDH	"glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase"
G418	néomycine ou généticine
HNF-4	"hepatocyte nuclear factor-4"
I-CAM	"intercellular cell adhesion molecule"
Ig	immunoglobuline
IT	domaine cytoplasmique
ITIM	"immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif"
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LIF	"leukemia inhibitory factor"
mAb	anticorps monoclonal

M	domaine membranaire
<i>me</i>	"motheaten"
<i>me</i> <sup>s</sup>	"viable motheaten"
MHV	"murine hepatitis virus"
MHVR	"murine hepatitis virus receptor"
<i>Min</i>	"multiple intestinal neoplasia"
mRNA	"messenger RNA"
N-CAM	"neural cell adhesion molecule"
N-terminal	amino-terminal
NCA	"non specific cross-reacting antigen"
<i>neo</i> <sup>r</sup>	gène de résistance à la néomycine
NK	"natural killer"
PBS	"phosphate-buffered saline"
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
pfu	unité formant une plage de lyse
PGK	"phosphoglycerate kinase"
PSG	"pregnancy specific glycoproteins"
Ptp1c	"protein tyrosine phosphatase-1c"
RBC	"red blood cell"
RNA	"ribonucleic acid"
RSV	"rous sarcoma virus"
RT-PCR	transcription inverse suivie de PCR

SDS	"sodium dodecyl sulfate"
SSC	"salt sodium citrate"
SHP-1	"src-homology phosphatase-1"
TGF- $\alpha$	"transforming growth factor $\alpha$ "
TGF- $\beta_1$	"transforming growth factor $\beta_1$ "
TIMPs	"tissue inhibitor metalloproteases"
TK	thymidine kinase
TM	domaine transmembranaire
tRNA	"transfer RNA"
uPA	"urokinase-type plasminogen activator"
USF	"upstream stimulatory factor"
V-CAM	"vascular cell adhesion molecule"
5' et 3' NT	régions non-traduites situées en 5' et 3' de l'ARNm

## REMERCIEMENTS

J'aimerais profiter de cette occasion pour remercier tous les membres du laboratoire de Nicole Beauchemin pour leur aide et leur support dans la réalisation de ce projet. J'aimerais remercier plus particulièrement Nicole Beauchemin, ma directrice de maîtrise, pour son soutien, son aide technique, pour la préparation du manuscrit présenté au chapitre 2 et la révision critique des chapitre 1, 3 et 4 de ce mémoire et pour de nombreuses discussions ayant contribué à l'élaboration des idées développées au chapitre 4 de ce mémoire. J'aimerais également souligner le soutien et la précieuse aide technique que Claire Turbide m'a apportés tout au long de ce projet.

J'aimerais de plus remercier particulièrement Dr Eugene Daniels pour les résultats présentés au chapitre 2 de ce mémoire, pour m'avoir appris les techniques d'analyse immunohistochimique, et pour m'avoir enseigné les notions d'embryologie sans lesquelles la rédaction du chapitre 4 aurait été impossible. J'aimerais aussi remercier Dr Michel Tremblay pour l'aide technique et matérielle fournie dans l'expérience de génération des cellules de souche embryonnaire mutantes.

J'aimerais finalement remercier le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche et le Fond Canderel/FCAR du Centre de Cancérologie de McGill pour leur soutien financier.

## PRÉFACE

Le manuscrit intitulé "Rôles des antigènes carcinoembryonnaires dans l'initiation et la progression tumorales" présenté au chapitre 1 de ce mémoire a été accepté pour publication dans la revue *Médecine Science* en 1997, dans le cadre d'un numéro spécial sur la recherche effectuée à l'Université McGill. Ma contribution à cet article de revue consiste en la préparation du manuscrit, qui fut révisé et corrigé par Nicole Beauchemin. Cet article de revue, qui présente les principaux membres de la famille des antigènes carcinoembryonnaires, tient lieu d'introduction à ce mémoire.

L'article scientifique intitulé "Biliary glycoprotein 1 expression during embryogenesis: correlation with events of epithelial differentiation, mesenchymal-epithelial interactions, absorption and myogenesis" reproduit au chapitre 2 de ce mémoire fut publié dans la revue *Developmental Dynamics* 1996; 206: 272-290. Cet article est le résultat du travail accompli par Dr Eugene Daniels dans le laboratoire de Nicole Beauchemin pendant une année sabbatique. Il a effectué la majorité des analyses immunohistochimiques, en a analysé les résultats et a participé à l'élaboration du manuscrit. Claire Turbide a participé à l'étude par RT-PCR de l'expression de l'ARNm de *bgp1* chez les embryons de souris présentée à la figure 1 de l'article. N. Kuprina, T. Rudinskaya et A.C. Yazova d'une part, ainsi que K. Holmes d'autre part nous ont fourni respectivement les anticorps monoclonaux spécifiques à Bgp1 AgB10 et CC1. G.S. Dveksler mit à notre disposition les protéines Bgp1 mutantes qui servirent à caractériser les anticorps. Nicole Beauchemin a également participé à l'étude par RT-PCR de

l'expression de l'ARNm de *hgp1* chez les embryons de souris et est responsable de la rédaction de cet article. Ma contribution à ces résultats consiste en l'étude des épitopes reconnus par les anticorps utilisés dans les analyses histoimmunochimiques ainsi qu'en ma participation à ces analyses histoimmunochimiques sous la supervision de Eugene Daniels. Les résultats présentés dans cet article sont essentiels pour l'analyse des souris *hgp1* <sup>-/-</sup>, dont la génération est abordée au chapitre 3 de ce mémoire.

Le chapitre 3 de ce mémoire rapporte les expériences non-publiées que j'ai effectuées pour générer les cellules de souche embryonnaire de souris *hgp1* <sup>-/-</sup>, qui auraient éventuellement servi à la production de souris *hgp1* <sup>-/-</sup>. Je fus la principale responsable de l'exécution de ces expériences, sous la supervision de Nicole Beauchemin.

Les cinq paragraphes suivants sont extraits des règlements de la Faculté des Études Graduées et de la Recherche de l'Université McGill. Ils doivent être reproduits intégralement dans la préface d'un mémoire.

"Candidates have the option of including, as part of the thesis, the text of a paper(s) submitted or to be submitted for publication, or the clearly-duplicated text of a published paper(s). These texts must be bound as an integral part of the thesis.

If this option is chosen, connecting texts that provide logical bridges between the different papers are mandatory. The thesis must be written in such a way that it is more than a mere collection of manuscripts; in other words, results of a series of papers must be integrated.

The thesis must still conform to all other requirements of the "Guidelines for Thesis Preparation". The thesis must include: A Table of Contents, an Abstract in English and French, an introduction which clearly states the rationale and objectives of the study, a comprehensive review of the literature, a final conclusion and summary, and a thorough bibliography or reference list.

Additional material must be provided where appropriate (e.g. in appendices) and in sufficient detail to allow a clear and precise judgement to be made of the importance and originality of the research reported in the thesis.

In the case of manuscripts co-authored by the candidate and others, the candidate is required to make an explicit statement in the thesis as to who contributed to such work and to what extent. Supervisors must attest to the accuracy of such statements at the doctoral oral defense. Since the task of the examiners is made more difficult in these cases, it is the candidate's interest to make perfectly clear the responsibilities of all the authors of the co-authored papers. Under no circumstances can a co-author of any component of such a thesis serve as an examiner for that thesis."

## **CHAPITRE 1: INTRODUCTION**

### **RÔLES DES ANTIGÈNES CARCINOEMBRYONNAIRES DANS L'INITIATION ET LA PROGRESSION TUMORALES**

Un manuscrit de Stéphanie Létourneau et Nicole Beauchemin accepté pour publication  
par la revue *Médecine Science*.

Les membres de la famille de l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) font partie de la superfamille des Immunoglobulines. Ces protéines sont fortement glycosylées et certaines sont liées à la membrane cytoplasmique alors que d'autres sont sécrétées. L'expression de plusieurs de ces protéines est modulée dans les cellules cancéreuses. CEA, le prototype de la famille, est régulé à la hausse dans les cellules tumorales; cette hausse en fait un marqueur de tumeur utilisé depuis trente ans en oncologie et un outil pour de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques. La glycoprotéine biliaire (BGP), un autre membre de la famille, est régulée à la baisse dans les tumeurs et peut agir comme suppresseur de tumeur, ce qui en fait un bon candidat pour la thérapie génique. Ces deux protéines sont impliquées dans l'adhérence cellulaire et cette fonction serait en partie responsable de la réorganisation tissulaire pendant la période embryonnaire. Les protéines spécifiques à la grossesse (PSG) se retrouvent dans les cellules trophoblastiques du placenta et servent de marqueurs d'anomalies pendant la période de la grossesse. Les membres de la famille carcinoembryonnaire contribuent donc au processus tumorigénique et métastatique des cellules cancéreuses en utilisant des mécanismes d'action différents.

**English title: ROLES OF CARCINOEMBRYONIC ANTIGENS IN TUMOR INITIATION AND PROGRESSION**

The Carcinoembryonic Antigen (CEA) gene family belongs to the Immunoglobulin gene superfamily. This family is divided in two protein subgroups, some of these proteins being membrane-bound while others are secreted. In this review, we will discuss CEA (the family prototype), the Biliary Glycoproteins (BGP) and the Pregnancy Specific Antigens (PSG). CEA is a membrane-associated glycoprotein expressed mainly in the gut epithelium and is up-regulated in tumor cells. It has been used in the last thirty years as a tumor marker. It functions *in vitro* as a cell adhesion molecule and a differentiation inhibitor. BGP, a membrane-bound protein, is expressed in many types of epithelial and endothelial cells as well as in cells of the immune system. It is down-regulated in many carcinomas. BGP functions *in vitro* as a cell adhesion molecule and acts as a tumor suppressor which is presently tested for use in gene therapy. PSGs are mainly expressed by trophoblastic cells during pregnancy. These proteins are also overexpressed in many tumors of trophoblastic origin. The family of CEA proteins exhibit similarity of structure but disparity of functions and contribute to tumorigenesis and metastasis by different mechanisms.

En 1965, les docteurs Phil Gold et Samuel Freedman, de l'Université McGill, découvrirent une protéine de haut poids moléculaire, fortement glycosylée, qu'ils nommèrent antigène carcinoembryonnaire (CEA). Cette protéine est exprimée abondamment dans les tumeurs de côlon et dans le côlon foetal et en faible concentration dans le côlon adulte normal [1]. Par contre, comme le CEA est surexprimé jusqu'à 60 fois dans les tumeurs du côlon et se trouve libéré dans le sérum, sa concentration sérique est utilisée cliniquement pour le suivi thérapeutique des patients cancéreux [2].

On sait maintenant qu'il existe chez l'humain plusieurs protéines très similaires au CEA. L'analyse des structures primaires et secondaires de ces protéines permet de mettre en lumière leurs points communs (Figure 1). Elles sont constituées d'un domaine N-terminal de 108 à 110 acides aminés similaire aux domaines variables des immunoglobulines (Ig), et d'un certain nombre de domaines (nommés  $A_n$ : 92 acides aminés et  $B_n$ : 86 acides aminés), homologues aux domaines constants des Ig. Le nombre de domaines Ig constants varie de 0 (CGM7) à 6 (CEA). Le domaine extracellulaire de ces protéines est fortement glycosylé (CEA: 28 sites de glycosylation liés à l'asparagine, BGP: 16 sites de glycosylation) [2]. La famille des gènes CEA fait donc partie de la superfamille des immunoglobulines. Cette superfamille comprend, entre autres, les immunoglobulines, les récepteurs antigéniques des lymphocytes T et des molécules d'adhérence intercellulaire telles que N-CAM [2].

Ces protéines proviennent de la transcription de 29 gènes formant la famille des gènes *CEA* (trois sont des pseudogènes). Ces gènes peuvent être divisés en deux sous-groupes (Figure 1). Le premier groupe, de neuf membres, produit des protéines liées à la surface cellulaire par un lien phosphatidyl inositol (ex. CEA) ainsi que des protéines membranaires possédant un domaine cytoplasmique (ex. Glycoprotéine Biliaire, BGP). Le second groupe, qui comprend 17 membres collectivement appelés *PSG* (Pregnancy-Specific Glycoproteins), produit des protéines sécrétées.

Les gènes de chaque sous-groupe présentent de 80 à 95% d'homologie entre eux, alors que les sous-groupes sont homologues de 65 à 75% entre eux [2].

Chez l'humain, les gènes de la famille CEA sont regroupés sur le bras long du chromosome 19, dans la région 19q13.1-19q13.3 (Figure 2). La sous-famille des gènes *PSG* est regroupée dans la partie distale de cette région. Les gènes *BGP* et *PSG* ont été retrouvés chez l'humain, les primates, le rat et la souris alors que le gène *CEA* se retrouve chez l'humain et les primates seulement. Des études de comparaisons par ordinateur simulant l'évolution ont démontré que la famille CEA provient de l'amplification d'un gène primordial (probablement très similaire à *BGP*), qui a donné naissance, assez tôt dans l'évolution des mammifères, à la branche *PSG* de la famille, et, plus tard, au gène *CEA* et aux membres de la famille liés à la membrane par un lien phosphatidyl inositol [2].

L'organisation génomique est bien conservée au sein de la famille CEA (Figure 3). La structure prototypique est constituée d'un premier exon qui comprend une région 5' non-traduite (5'NT) et environ les deux tiers de la région leader (L; traduite, celle-ci permet l'introduction de la protéine dans le réticulum endoplasmique et sera clivée dans la maturation de la protéine). Le deuxième exon est composé du reste de la région leader et de la région N-terminale (N). Suivent un nombre variable d'exons, chacun codant pour un domaine A ou B. On trouve ensuite soit un domaine permettant le lien lipidique à la membrane (M), soit un domaine transmembranaire (TM) suivi d'exons comprenant les domaines cytoplasmiques (Cyt), soit, pour les protéines sécrétées, un domaine C-terminal (C), le tout suivi d'exons comprenant la région 3'non-traduite (3'NT). L'épissage alternatif du gène *BGP* permet l'expression de plusieurs isoformes (douze chez l'humain), variant tant par le nombre de domaines Ig dans leur portion extracellulaire que par la séquence de leur domaine cytoplasmique [2].

L'homologie entre les gènes de la famille CEA se reflète aussi dans leurs promoteurs: les 500

pb en amont du site d'initiation de la transcription sont homologues à environ 70%. L'homologie (79%) entre les promoteurs de *BGP* et *CEA* s'étend jusqu'à 1100 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Les promoteurs des gènes de la famille *CEA* sont dépourvus de boîtes TATA ou CAAT classiques. Par contre, les différents membres de la famille ont des patrons d'expression différents (voir ci-dessous), et ces différences sont régulées en partie au niveau transcriptionnel. En effet, de longues portions des promoteurs, en amont des régions homologues, sont différentes entre elles. Plusieurs facteurs de transcription interagissent avec le promoteur de chacun de ces gènes (*CEA*: USF et Sp1; *BGP*: USF et HNF-4)[3,4]. Il est donc probable qu'au cours de l'évolution, ces protéines, relativement semblables au niveau de leur structure, aient développé des fonctions différentes, nécessitant des localisations tissulaires différentes. Les promoteurs, assez conservés dans certaines régions, sont par contre très dissemblables dans d'autres, permettant ainsi des modes d'expression différents.

Nous nous pencherons plus particulièrement, après ce bref survol de la famille des gènes *CEA*, sur trois de ses membres, soit le *CEA*, le *BGP* et enfin sur les *PSG*.

### **ANTIGÈNE CARCINOEMBRYONNAIRE (CEA)**

Le *CEA*, prototype de la famille, est une protéine d'environ 180 à 200 kDa. Près de 60% de son poids moléculaire est constitué d'hydrates de carbone. La fonction physiologique de cette protéine reste encore imprécise. Nous présenterons ici l'antigène carcinoembryonnaire en décrivant son mode d'expression, ses fonctions connues et les utilisations et possibilités cliniques de cette protéine.

Chez l'adulte, cette protéine est exprimée principalement dans certaines portions du tube digestif. On la retrouve à la surface apicale des cellules de l'épithélium de la langue, de la portion distale de l'oesophage, de l'estomac, du petit intestin, du côlon et du rectum [5]. Le *CEA* est

présent à la surface des microvillosités des cellules cylindriques absorptives et des cellules à gobelet du petit intestin et du côlon ainsi que dans le mucus produit par ces dernières [6]. L'épithélium du côlon forme des cryptes au fond desquelles se trouvent des cellules progénitrices qui prolifèrent activement pour renouveler l'épithélium et ce, même pendant la vie adulte. L'expression du CEA dans ces cellules est faible. Plus haut dans la crypte et à la surface de l'épithélium, l'expression du CEA augmente. Dans des conditions normales, chez l'adulte, cette glycoprotéine est toujours exprimée à la surface apicale des cellules épithéliales: on ne la retrouve pas à la membrane basolatérale [6].

L'antigène carcinoembryonnaire apparaît chez le fœtus vers la 9e semaine, dans le duodénum et le côlon [5]. Son mode d'expression durant le développement est similaire à celui retrouvé chez l'adulte. Il est intéressant toutefois de remarquer qu'au moment où cet antigène commence à être exprimé dans l'épithélium du côlon, celui-ci n'est pas encore stratifié. Cette protéine est alors présente sur toute la surface de la membrane cellulaire. La structure épithéliale mature et les microvillosités n'apparaîtront qu'au cours du second trimestre du développement embryonnaire et coïncideront avec la restriction du CEA au domaine apical de la cellule. On peut donc supposer un lien entre la localisation cellulaire du CEA et le degré de différenciation de la cellule. Cette corrélation sera renforcée, on le verra ci-dessous, par l'expression du CEA dans les cellules cancéreuses.

En 1987, notre équipe procéda au clonage de l'ADNc du CEA [7]. Ceci permit l'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans l'élucidation de ses fonctions. Le CEA étant localisé à la membrane cellulaire et faisant partie d'une superfamille dont plusieurs membres sont impliqués dans des processus de reconnaissance intercellulaire et d'adhérence, il était tentant de postuler que le CEA est une molécule d'adhérence intercellulaire. En 1989, le laboratoire de Clifford Stanners a démontré que des cellules ovariennes de hamster (LR-73, dépourvues de

CEA) transfectées avec l'ADNc du *CEA* forment des grappes de cellules alors que les cellules parentales restent isolées. La formation de ces grappes est inhibée de façon spécifique par des fragments Fab d'anticorps anti-CEA [8]. L'antigène carcinoembryonnaire est capable d'adhérence homotypique (CEA-CEA) et hétérotypique avec d'autres membres de la famille CEA (CEA-BGP, CEA-NCA)[9]. Des études subséquentes ont démontré que les domaines du CEA impliqués dans l'adhérence sont les domaines N-terminal et A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>, selon un modèle dénommé: "double réciprocité" (Figure 4). Ce modèle fut confirmé par l'inhibition de l'adhérence en présence de peptides dérivés de ces domaines [10]. Les modulations de l'adhérence intercellulaire représentent un événement important du développement embryonnaire et de la tumorigénèse. Le mode d'expression du CEA et sa capacité à assurer l'adhérence cellulaire *in vitro* suggèrent que le CEA joue un rôle dans ces phénomènes.

Plusieurs souches de bactéries *E.coli* d'origine humaine adhèrent à la protéine CEA et à d'autres membres de la famille exprimés dans le côlon (BGP, NCA)[11]. Il est possible que ces glycoprotéines soient impliquées dans la reconnaissance des bactéries présentes dans la lumière du côlon et donc, dans la régulation de la colonisation bactérienne de l'intestin.

La surexpression du CEA correspond à des situations où les cellules sont moins différenciées, ce qui suggère un rôle pour le CEA dans le processus de la différenciation. Cette hypothèse a été vérifiée en étudiant l'effet de l'expression ectopique du CEA dans des cellules myoblastiques de rat (L6). Ces cellules peuvent se différencier *in vitro* en myotubes suite à un changement dans la concentration des facteurs de croissance du milieu de culture. Les cellules myoblastiques L6 transfectées avec l'ADNc du *CEA* ne peuvent se différencier. Ce phénotype est renversé dans des conditions qui inhibent l'adhérence cellulaire assurée par le CEA [12]. Il semble donc que l'inhibition de la différenciation des cellules L6 dépende entre autre de la capacité du CEA à assurer la médiation de l'adhérence intercellulaire.

La hausse de l'expression du CEA dans les tumeurs du côlon a été démontrée par immunohistochimie, par hybridation *in situ* ou par cytométrie de flux. Par exemple, une étude d'hybridation *in situ* quantitative de seize cas d'adénocarcinomes du côlon montre une hausse de 2.6 fois de l'expression du CEA dans les cellules tumorales par rapport à celle du côlon normal. Ces résultats ont été confirmés par immunohistochimie. De plus, la localisation apicale du CEA s'en trouve perturbée: on retrouve maintenant cette protéine sur toute la surface de la cellule ainsi que dans l'espace intercellulaire [6] (Figure 5). Plusieurs hypothèses ont été formulées quant au rôle possible du CEA dans la tumorigénèse. Une surexpression du CEA et une délocalisation cellulaire pourraient inhiber la différenciation cellulaire. Mais l'abondance du CEA pourrait aussi modifier les propriétés adhésives des cellules de façon à favoriser la dissémination métastatique.

Le potentiel de croissance de tumeurs primaires de côlon transplantées dans des souris immunologiquement déficientes est corrélé avec le taux sanguin pré-opératoire du CEA du patient [13]. De plus, le potentiel métastatique d'une lignée cellulaire de carcinome colorectal humain (SW1222), testé par injection intrasplénique dans des souris immunologiquement incompetentes, est augmenté par la transfection de l'ADNc du CEA dans ces cellules [14]. La capacité d'aggrégation des cellules tumorales est associée au potentiel métastatique, probablement parce que des grappes de cellules seront plus facilement immobilisées dans la microvasculature (Figure 5). Le CEA favorise peut-être le développement des métastases par adhérence homotypique. Par ailleurs, il existe des récepteurs spécifiques au CEA sur les cellules de Kupffer dans le foie et sur les macrophages alvéolaires dans le poumon [15]. Le foie est un des sites les plus fréquents d'implantation de métastases des tumeurs du côlon: il est possible que l'arrêt et l'implantation des cellules tumorales dans cet organe soient favorisés par la liaison du CEA à ces récepteurs. Le CEA jouerait donc un rôle important dans le processus métastatique de par sa présence à la surface des cellules tumorales.

Le taux sanguin du CEA est généralement élevé chez les patients atteints de divers types de tumeurs: côlon, sein, poumon, ovaires, etc. Toutefois, comme la concentration de CEA dans le sérum est également élevée dans d'autres situations, par exemple chez les fumeurs et dans les cas de cirrhose alcoolique, on ne peut utiliser ce critère pour le dépistage des tumeurs. Par contre, une fois la tumeur diagnostiquée, le CEA devient un bon marqueur de l'évolution de la maladie. Cliniquement il est utilisé post-chirurgicalement comme indicateur de récurrence locale de la tumeur ou lors de l'apparition de métastases. On exploite depuis une trentaine d'années cette propriété du CEA dans le suivi des patients cancéreux [2].

La présence de CEA sur les cellules tumorales est aussi utilisée pour le développement d'autres méthodes diagnostiques et de traitements potentiels. Par exemple, des anticorps monoclonaux anti-CEA marqués avec  $^{131}\text{I}$  sont utilisés à faible dose en immunoscintigraphie pour repérer les tumeurs primaires ou les métastases (sensibilité: 86%) ou à plus haute dose pour traiter la tumeur par radiation [16]. Ces nouvelles méthodes sont prometteuses.

Le CEA semble avoir chez l'humain plusieurs fonctions importantes qu'il serait plus facile de pouvoir étudier dans un modèle animal. Suite au clonage de *CEA*, notre groupe tenta de trouver l'homologue du *CEA* chez la souris. Un tel gène ne fut jamais trouvé et n'existe fort probablement pas. Cette absence du CEA fut aussi constatée chez le rat et il semblerait que seuls les primates exprimeraient un homologue du CEA bien qu'aucun gène de cette famille n'ait encore été caractérisé de cette espèce. Des lignées de souris transgéniques exprimant le gène complet du *CEA* ont récemment été créées: l'expression du CEA chez ces mammifères n'a donné lieu à aucune malformation évidente, ni à aucune déficience immunologique chez l'animal. Il semble donc que l'expression de cette protéine soit généralement bien tolérée dans ce système et donc, ce nouveau modèle animal est maintenant utilisé pour le développement de vaccins anti-CEA de même que pour l'évaluation de thérapies visant le ciblage spécifiques des tumeurs

exprimant le CEA.

### **GLYCOPROTEINES BILIAIRES (BGP)**

Chez la souris, un autre membre de la famille du CEA fut par contre découvert: il s'agit de *bgp1*, l'homologue du *BGP* humain [17]. A l'origine, BGP fut identifié comme un antigène démontrant une réaction croisée avec les anticorps anti-CEA. Ce nouvel antigène était présent dans la bile, d'où son nom, Glycoprotéine Biliaire [18]. Simultanément, d'autres laboratoires purifiaient une protéine responsable de l'aggrégation des hépatocytes, une protéine des hépatocytes possédant une activité ecto-ATPase et une protéine responsable du transport des acides biliaires dans les hépatocytes. Quand les ADNc des ces protéines furent clonés, on s'aperçut qu'il s'agissait de la même entité. Ceci explique la multiplicité des noms associés au BGP dans la littérature (*bgp*, *c-cam*, HA4, ecto-ATPase, pp120, CD66)[19].

Un seul gène *BGP* existe chez l'humain. Cependant, chez la souris, on trouve trois gènes de type *BGP*, dont deux sont très similaires au gène *BGP* humain au niveau de leur structure génomique et de la séquence de leurs acides aminés [20,21]. Chez le rat, un seul homologue du gène *BGP* humain est connu (*c-cam*) [19].

BGP est le seul membre de la famille CEA possédant des domaines cytoplasmiques (Cyt). Plusieurs isoformes sont générés par épissage alternatif. Ces isoformes varient quant au nombre de domaines constants Ig et leurs domaines Cyt. Ces derniers sont composés de 71-73 acides aminés selon l'espèce ou de 10 acides aminés. Toutes les isoformes comportent un domaine N-terminal (domaine Ig variable) (Figure 1). La structure intron/exon ainsi que le mode d'épissage sont conservés entre les espèces. Les domaines cytoplasmiques sont cependant les plus conservés, ce qui suggère qu'ils remplissent une fonction essentielle [19].

L'expression de BGP a été étudiée chez l'humain, la souris et le rat, dans les tissus adultes et

embryonnaires et dans les tumeurs. Une excellente concordance dans les modes d'expression interespèces a été observée. Deux observations générales se dégagent du mode d'expression de BGP: BGP est présent du côté apical des cellules épithéliales et à la surface des cellules du système hématopoïétique. On retrouve cette protéine dans le côlon, du côté apical des cellules absorbives et dans le glycocalyx luminal se trouvant à leur surface [22]. On la retrouve également dans les cellules de l'épithélium endométrial où son expression est régulée par l'estrogène et la progestérone. BGP est aussi exprimée dans l'épithélium de la prostate, où sa production est régulée par les androgènes, de même que du côté canaliculaire des hépatocytes et du côté apical des cellules des tubules rénaux. BGP est de plus présente du côté luminal des cellules endothéliales des capillaires, des artérioles et des veinules. Plusieurs types de cellules hématopoïétiques expriment BGP: mégacaryocytes, plaquettes, leucocytes polymorphonucléaires et mononucléaires, macrophages, lymphocytes B et T activés. Sa fonction dans ces cellules est encore inconnue [19].

BGP est exprimée de façon très dynamique durant le développement. Chez le rat, l'homologue de BGP est exprimé à la surface du blastula avant l'implantation, mais disparaît au moment de l'implantation [23]. Chez la souris, notre laboratoire a démontré que l'embryon n'exprime pas *Bgp1* au moment de la gastrulation alors que les tissus extra-embryonnaires l'expriment abondamment. *Bgp1* apparaît dans l'embryon de souris à 8,5 jours *post-coïtum* (dpc) dans l'épiderme et son expression y est maintenue jusqu'à la naissance. Vers 10,5 dpc, *Bgp1* apparaît dans l'épithélium du tube digestif primitif. Le mode d'expression de *Bgp1* pendant le développement suggère que cette protéine exerce un rôle dans les interactions épithéliales-mésenchymateuses de plusieurs tissus (méninges, poumons, reins, pancréas, glandes salivaires) et dans la myogénèse, pendant la formation des myotubes secondaires. L'expression de BGP dans le foie foetal survient tardivement (15,5 dpc chez le rat) et reste faible jusqu'à la

naissance, où elle augmente rapidement [19]. L'expression de BGP durant le développement embryonnaire indique que cette protéine joue un rôle important bien qu'encore imprécis dans l'homéostasie foetale [24]. Ce rôle devrait être précisé prochainement dans des souris ayant subi une ablation génique *bgp1*.

Alors que l'expression de CEA est généralement augmentée dans les tumeurs du côlon, celle de BGP est abolie dans plusieurs lignées de cellules tumorales de côlon et dans les tumeurs primaires de côlon de souris. Nous avons démontré que la baisse d'expression de *Bgp1* chez la souris est un événement précoce durant la carcinogénèse: les tumeurs du côlon de stade A en sont déjà dépourvues [25]. De même, chez l'humain, l'examen de 21 tumeurs primaires du côlon a révélé que 80% de ces tumeurs exprimaient peu ou pas de BGP [26]. L'expression de BGP est également diminuée dans la prostate hyperplasique et précancéreuse [27]. Les carcinomes de prostate modérément et peu différenciés n'expriment pas de BGP alors que les glandes normales le synthétisent. Une diminution significative de l'expression de BGP a aussi été constatée dans les carcinomes du foie. Donc, BGP est régulée à la baisse dans plusieurs types de tumeurs [19].

Tout comme le CEA, les BGP fonctionnent *in vitro* comme molécules d'adhérence intercellulaire homotypique et sont capables d'adhérence hétérotypique avec d'autres membres de la famille CEA. Le domaine d'adhérence de BGP est le domaine N-terminal, et cette adhésion semble indépendante du domaine cyt de BGP [19] (Figure 4).

Le transport des acides biliaires du sang vers le canalicule biliaire s'effectue en deux étapes: d'abord du sang vers l'intérieur de l'hépatocyte, ensuite de l'hépatocyte vers la lumière du canalicule. BGP serait impliquée dans cette dernière étape du transport biliaire. La transfection de l'isoforme à domaine cyt long de BGP dans des cellules hétérologues confère à celles-ci un potentiel d'efflux d'acides biliaires [28]. De plus, des anticorps anti-BGP inhibent le transport des acides biliaires dans des vésicules de membrane de canalicules biliaires. Ces résultats suggèrent

que BGP serait associée au transport biliaire dans les hépatocytes. Par contre, n'ayant qu'un seul domaine transmembranaire, le mécanisme implique possiblement l'association de BGP en dimères ou avec d'autres protéines [19].

Bgp1 est aussi le récepteur des virus de l'hépatite chez la souris. Cette fonction de Bgp1 dépend de la présence de son domaine N-terminal [29]. Ceci démontre qu'*in vivo* Bgp1 peut agir dans un système récepteur-ligand pour une protéine de la capsid virale. Un ou plusieurs ligands physiologiques de bgp1 pourraient donc exister dans certaines cellules.

La régulation de BGP à la baisse dans plusieurs types de cellules tumorales a suscité des études visant à déterminer le potentiel de suppression tumorale de cette protéine. Nous avons inséré soit l'isoforme à domaine cyt long ou court de Bgp1 dans des cellules de carcinome du côlon de souris (CT51, normalement dépourvues de bgp1). Lors d'injections sous-cutanées dans des souris syngéniques immunocompétentes, seules les cellules CT51 transfectées avec l'isoforme B domaine cyt long voyaient leur potentiel de formation de tumeurs diminué (70-80% d'inhibition) [30]. Le même phénomène a été démontré de façon très convaincante pour les cellules tumorales prostatiques humaines [31] et pour les cellules humaines de carcinome du sein [19]. Il semble donc que BGP puisse agir comme un suppresseur de tumeur, et que cette fonction dépende de la présence du domaine cyt long mais non de la fonction d'adhérence intercellulaire de cette protéine.

Notre groupe travaille maintenant à l'élucidation de la signalisation intracellulaire dépendante de BGP. L'isoforme de BGP possédant un domaine cyt long est particulièrement intéressant. Certaines des fonctions de BGP en dépendent (association au transport des acides biliaires [28], suppression de tumeur [30]), alors que d'autres non (adhérence). Par ailleurs, ce domaine lie au moins trois protéines cytoplasmiques: calmoduline [32], annexine VI [19] et une tyrosine phosphatase, SHP-1 [33] (Figure 6). De plus, il contient plusieurs motifs connus dont un motif

"Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif" (ITIM) et plusieurs motifs de phosphorylation par la protéine kinase C. La tyrosine 488 du motif ITIM devient phosphorylée dans plusieurs situations expérimentales: le transport des acides biliaires [28], l'internalisation du récepteur de l'insuline et l'activation des neutrophiles [19]. Les protéines tyrosines kinases src, lyn et lck peuvent phosphoryler cette tyrosine *in vitro* [19]. De plus, nous avons démontré que l'association de SHP-1 dépend de la phosphorylation de la tyrosine 488 [33]. SHP-1 est impliqué dans la transduction de signal assurée par plusieurs récepteurs de surface des lymphocytes B. Tous ces résultats mis ensemble suggèrent que le BGP est un récepteur impliqué dans la transduction de signal [33]. Aucun ligand n'a cependant été fermement confirmé pour le BGP, mais plusieurs hypothèses sont intéressantes: une ou plusieurs des protéines du groupe des PSG, la sélectine E ou possiblement une protéine de la matrice extracellulaire (Figure 6). Ces hypothèses sont présentement évaluées expérimentalement.

Des résultats encourageants ont été obtenus dans des essais pré-cliniques visant à déterminer le potentiel de BGP en thérapie génique dans un modèle de cancer de la prostate. Les cellules humaines de carcinome de la prostate PC-3 ont pu être infectées par le vecteur de thérapie génique utilisé, soit l'adénovirus [34]. La présence de BGP dans les cellules PC-3 subsiste longtemps après l'infection (2-3 semaines) et est détectée même après que le matériel génique du vecteur ne soit plus décelable dans les cellules. Des souris injectées avec des cellules PC-3 parentales, tumorigéniques, ont vu leurs tumeurs régresser pendant au moins deux semaines lorsque traitées localement avec ce vecteur contenant l'ADNc de BGP. Ces résultats préliminaires sont encourageants et indiquent que le BGP pourrait être efficace en thérapie génique, au moins dans les cas de cancer de la prostate [34].

#### **GLYCOPROTEINES SPECIFIQUES A LA GROSSESSE (PSG)**

Les PSG forment le sous-groupe de protéines sécrétées de la famille des gènes CEA (Figure 3). Ce sous-groupe est constitué d'au moins 17 gènes. Pour les besoins de cette revue, nous traiterons globalement des PSG.

Les PSG furent d'abord identifiées comme des protéines présentes dans le sérum maternel durant la grossesse [35]. On sait maintenant qu'elles sont exprimées dans certaines cellules du placenta, des testicules, de l'intestin, de l'utérus, du système hématopoïétique, de la moëlle osseuse et du foie foetal [35]. Les fonctions des PSG comprendraient la modulation du système immunitaire maternel durant la grossesse et la stimulation de la croissance cellulaire [35].

Cliniquement, une élévation du taux de PSG sanguin est un indicateur de grossesse. La concentration de PSG dans le liquide amniotique est également révélatrice de certains désordres congénitaux du foetus: une augmentation de la concentration est observée pour les cas de syndrome de Meckel et de trisomies 18 et 21 [35]. Par ailleurs, une augmentation de PSG dans le sérum et dans les cellules tumorales est observée dans les cas de tumeurs trophoblastiques (môles hydatidiformes, choriocarcinomes), et dans les tumeurs du sein (quoique le taux de PSG dans le sang ne soit pas un indicateur fiable dans ce dernier cas).

## CONCLUSION

Le CEA et le BGP, quoique faisant partie de la même famille de gènes, n'ont certainement pas un rôle physiologique identique. Ces deux protéines sont exprimées durant le développement embryonnaire, mais le BGP est exprimée plus précocément et dans un plus grand nombre de types de cellules. Bien que le CEA et le BGP soient exprimés en tandem sur les cellules épithéliales du tube digestif, plusieurs observations indiquent que leurs fonctions soient différentes. D'abord, le BGP possède un domaine cytoplasmique s'associant avec des protéines intracellulaires alors que le CEA est lié à la surface membranaire par un lien lipidique. Ensuite, le

CEA est régulé à la hausse dans les tumeurs alors que le BGP l'est à la baisse. Ces deux glycoprotéines sont capables d'adhérence intercellulaire, mais par des mécanismes différents. Finalement, le CEA empêche la différenciation, alors que le BGP inhibe la prolifération tumorale, deux processus cellulaires qui ont tendance à s'opposer. L'évolution des espèces a généré dans la famille de CEA une étonnante diversité de protéines et les particularités de chaque membre permettent la multiplicité de spécialisation.

### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Dr. Serge Jothy pour de fructueuses discussions et corrections de même que le Conseil des Recherches Médicales du Canada et la Société de Recherches sur le Cancer Inc. pour le support financier des travaux de notre laboratoire. S.L. est boursière du Fonds de la Recherche en Santé du Québec et de la Faculté de Médecine de l'Université McGill et N.B. est chercheure senior du Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

### REFERENCES

- [1] Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122: 467-81.
- [2] Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen gene family: Molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 1991; 5: 344-66.
- [3] Hauck W, Stanners CP. Transcriptional regulation of the carcinoembryonic antigen gene. *J Biol Chem* 1995; 270: 3602-10.
- [4] Hauck W, Nédellec P, Turbide C, Stanners CP, Barnett TR, Beauchemin N. Transcriptional control of the human biliary glycoprotein gene, a CEA gene family

member down-regulated in colorectal carcinomas. *Eur J Biochem* 1994; 223: 529-41.

[5] Nap M, Møllgaard K, Burtin P, Jan Fleuren G. Immunohistochemistry of carcinoembryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumor Biol* 1988; 9: 145-53.

[6] Jothy S, Yuan SY, Shirota K. Transcription of carcinoembryonic antigen in normal colon and colon carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 250-57.

[7] Beauchemin N, Benchimol S, Cournoyer D, Fuks A, Stanners CP. Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 3221-30.

[8] Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 1989; 57: 327-34.

[9] Oikawa S, Inusuka C, Kuroki M, Arakawa F, Matsuoka Y, Kosaki G, Nakazato H. A specific heterotypic cell adhesion activity between members of carcinoembryonic antigen family, W272 and NCA, is mediated by N-domains. *J Biol Chem* 1991; 266: 7995-8001.

[10] Zhou H, Fuks A, Alcaraz G, Bolling TJ, Stanners CP. Homophilic adhesion between Ig superfamily carcinoembryonic antigen molecules involves double reciprocal bonds. *J Cell Biol* 1993; 122: 951-60.

[11] Leusch HG, Hefta SA, Drzeniek Z, Hummel K, Markos-Pusztai Z, Wagener C. *Escherichia coli* of human origin binds to carcinoembryonic antigen (CEA) and non-specific crossreacting antigen (NCA). *FEBS Lett* 1990; 261: 405-09.

[12] Eidelman F, Fuks A, DeMarte L, Taheri M, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen, an intercellular adhesion molecule, blocks fusion and differentiation of myoblasts. *J Cell Biol* 1993; 123: 467-75.

[13] Wagner HE, Toth CA, Steele GD, Thomas P. Metastatic potential of human colon cancer cell lines: relationship to cellular differentiation and carcinoembryonic antigen production. *Clin Exp Metastasis* 1992; 10: 25-31.

[14] Hashino J, Fukuda Y, Oikawa S, Nakazato H, Nakanishi T. Metastatic potential of human colorectal carcinoma SW1222 cells transfected with cDNA encoding carcinoembryonic antigen. *Clin Exp Metastasis* 1994; 12: 324-28.

[15] Toth, CA. Carcinoembryonic antigen binding proteins on elicited peritoneal macrophages. *J Leukocyte Biol* 1992; 51: 466-71.

[16] Juweid M, Sharkey RM, Behr TM, Swayne LC, Dunn R, Ying Z, Siegel JA, Hansen HJ, Goldenberg DM. Clinical evaluation of tumor targeting with the anticarcinoembryonic antigen murine monoclonal antibody fragment, MN-14 F(ab)<sub>2</sub>. *Cancer* 1996; 78: 157-68.

[17] McCuaig K, Turbide C, Beauchemin N. mmCGM1a: a mouse carcinoembryonic antigen gene family member, generated by alternative splicing, functions as an adhesion molecule. *Cell Growth Diff* 1992; 3: 165-74.

[18] Svenberg T. Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile: Isolation and partial characterization. *Int J Cancer* 1976; 17: 588-96.

[19] Beauchemin N, Lin SH. (sous presse). Role of C-CAM as a tumour suppressor. "Cell Adhesion and Communication". C.P. Stanners (ed.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, chap. 9.

[20] Nédellec P, Turbide C, Beauchemin N. Characterization and transcriptional activity of the mouse biliary glycoprotein 1 gene, a carcinoembryonic antigen-related gene. *Eur J Biochem* 1995; 231: 104-14.

[21] Nédellec P, Dveksler GS, Daniels E, Turbide C, Chow B, Basile AA.

Holmes KV, Beauchemin N. *Bgp2*, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J Virol* 1994; 68: 4525-4537.

[22] Frangsmyr I, Baranov V, Prall F, Yeung M M-W, Wagener C, Hammarstrom S. Cell- and region-specific expression of biliary glycoprotein and its messenger RNA in normal human colonic mucosa. *Cancer Res* 1995; 55: 2963-67.

[23] Svalander PC, Odin P, Nilsson BO, Obrink B. Trophectoderm surface expression of the cell adhesion molecule cell-CAM 105 on rat blastocysts. *Development* 1987; 100: 653-60.

[24] Daniels E, Létourneau S, Turbide C, Kuprina N, Rudinskaya T, Yazova AC, Holmes KV, Dveksler GS, Beauchemin N. Biliary glycoprotein I expression during embryogenesis: Correlation with events of epithelial differentiation, mesenchymal-epithelial interactions, absorption and myogenesis. *Dev Dynamics* 1996; 206: 272-90.

[25] Rosenberg M, Nédellec P, Jothy S, Fleischer D, Turbide C, Beauchemin N. The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is down-regulated in malignant mouse tissues. *Cancer Res* 1993; 53: 4938-45.

[26] Neumaier M, Paululat S, Chan A, Matthaes P, Wagener C. Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10744-48.

[27] Kleinerman DI, Troncoso P, Lin S-H, Pisters LL, Sherwood ER, Brooks T, von Eschenbach AC, Hsieh J-T. Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: Implication as a tumor suppressor. *Cancer Res* 1995; 55: 1215-20.

[28] Sippel CJ, Fallon RJ, Perlmutter D. Bile acid efflux mediated by the rat liver canalicular bile acid transport/Ecto-ATPase protein requires serine 503 phosphorylation and is regulated by tyrosine 488 phosphorylation. *J Biol Chem* 1994; 269: 19539-45.

[29] Dveksler GS, Pensiero MN, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, Basile AA, Elias PE, Holmes KV. Mouse coronavirus MHV-A59 and blocking anti-receptor monoclonal antibody bind to the N-terminal domain of cellular receptor MHVR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1716-20.

[30] Kunath T, Ordonez C, Turbide C, Beauchemin N. Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene* 1995; 11: 2375-82.

[31] Hsieh JT, Luo W, Song W, Wang Y, Kleinerman DL, Van NT, Lin SH. Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) in prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches. *Cancer Res* 1995; 55: 190-197.

[32] Edlund M, Blikstad L, Obrink B. Calmodulin binds to specific sequences in the cytoplasmic domain of C-CAM and down-regulates C-CAM self-association. *J Biol Chem* 1996; 271: 1393-99.

[33] Beauchemin N, Kunath T, Robitaille J, Chow B, Turbide C, Daniels E, Veillette A. Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene* 1997; sous presse.

[34] Kleinerman DL, Zhang WW, Lin SH, Van NT, von Eschenbach AC, Hsieh JT. Application of a tumor suppressor (C-CAM1)-expressing recombinant adenovirus in androgen-independent human prostate cancer therapy: A preclinical study. *Cancer Res* 1995; 55: 2831-36.

[35] Chan WY. The pregnancy-specific 81 glycoprotein family. *Adv Contr Deliv*



## LEGENDES DES FIGURES

Figure 1. **Représentation schématique des protéines de la famille CEA.** Sont représentés NCA et CGM6. CEA: six isoformes de BGP et trois des protéines PSG. Ces protéines sont constituées de domaines immunoglobulines de type variable (N) et constants (A et B). Les CEA, NCA et CGM6 sont ancrés à la membrane par un lien lipidique alors que les BGP ont des domaines cytoplasmiques. Les PSGs sont sécrétées.

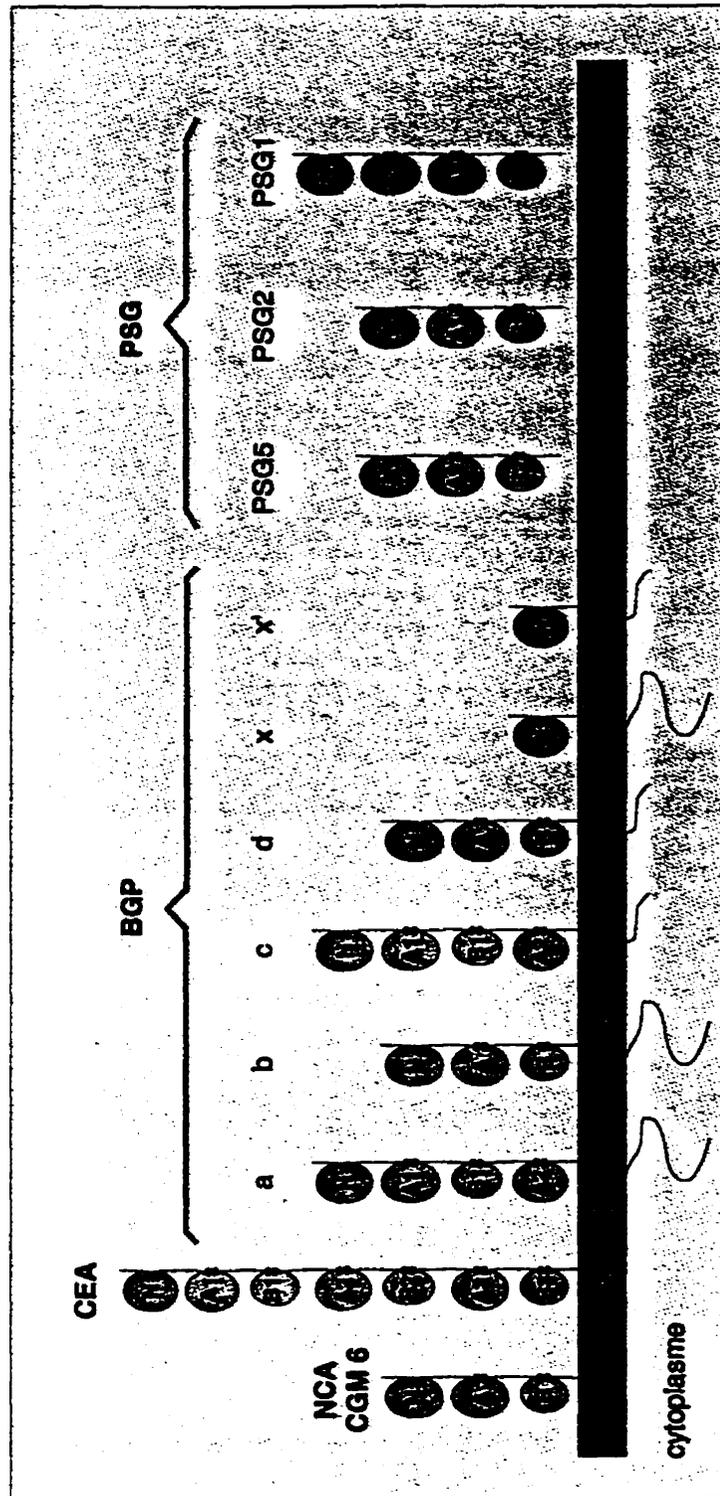
Figure 2. **Représentation du locus de la famille de gènes CEA sur le bras long du chromosome 19.** CEA: antigène carcinoembryonnaire. CGM<sub>n</sub>: CEA gene family member. NCA: normal crossreacting antigen. BGP: gène des glycoprotéines biliaires. PSG: gènes des glycoprotéines spécifiques à la grossesse. Les flèches indiquent l'orientation transcriptionnelle.

Figure 3. **Organisation génomique de trois des gènes de la famille CEA.** Les trois gènes présentent une étonnante conservation de leurs structures génomiques et même de leurs promoteurs proximaux respectifs. Les boîtes représentent les exons codant pour les différents domaines des protéines. 5'NT: région 5' non-traduite. L: région leader. N: région N-terminale, homologue aux domaines variables des immunoglobulines. A<sub>n</sub> et B<sub>n</sub>: domaines homologues aux domaines constants des immunoglobulines. M: domaine permettant l'ancrage de la protéine à la membrane cellulaire par un lien lipidique. TM: domaine transmembranaire. Cyt: domaine cytoplasmique, C: domaine C-terminal de la protéine sécrétée. 3'NT: région 3' non-traduite. ATG: codon initiateur. TGA: codon de terminaison. TGA(C): codon de terminaison dans les transcrits codant pour BGP à domaine cytoplasmique court. TGA(L): codon de terminaison dans les transcrits codant pour BGP à domaine cytoplasmique long.

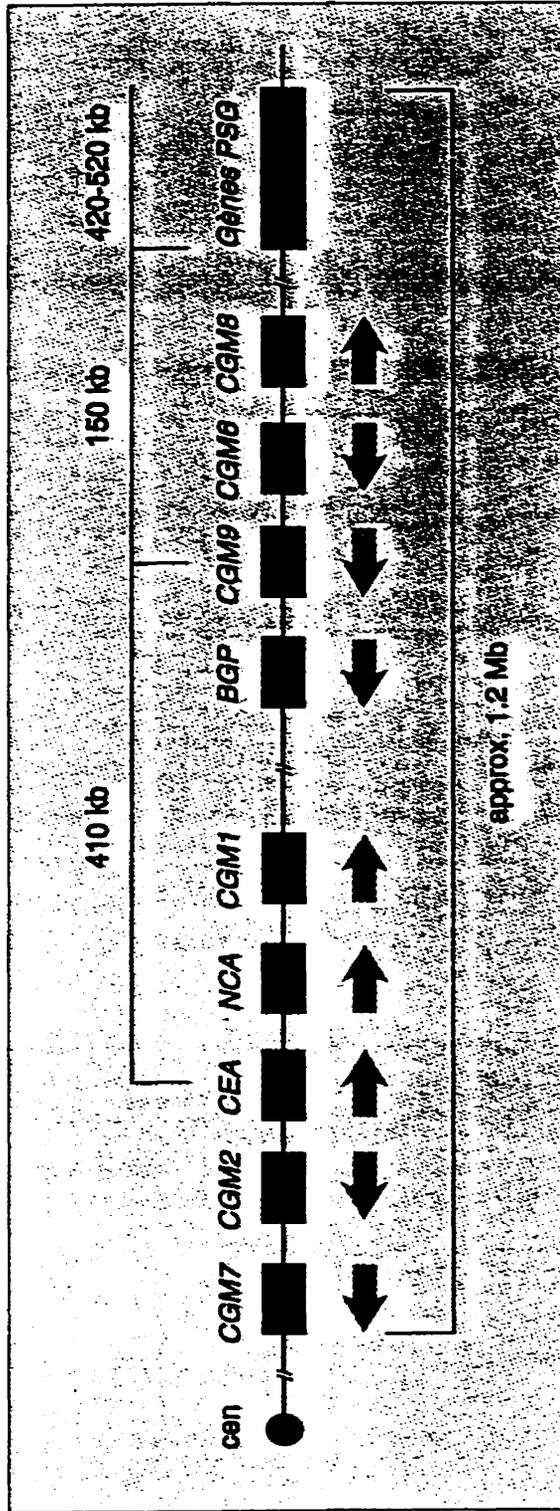
Figure 4. **Domaines d'adhérence de CEA et de BGP.** Les domaines du CEA impliqués dans l'adhérence cellulaire sont les domaines N-terminaux et A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> selon un mécanisme de double-réciprocité. Seuls les domaines N-terminaux de BGP sont impliqués dans cette fonction.

Figure 5. **Schéma illustrant le rôle de CEA dans le processus métastatique.** Le CEA est exprimé sur le glycocalyx de cellules épithéliales normales, mais se retrouve sur toute la surface de la cellule tumorale. Cette cellule tumorale infiltre un capillaire, circule jusqu'à son point d'ancrage et adhère à une cellule du foie, peut-être à l'aide d'un récepteur spécifique au CEA. Ep: cellules épithéliales, Mb: membrane basale, Fi: fibroblaste, En: cellules endothéliales, Tu: cellules tumorales, Pl: plaquettes, Ku: cellule de Kupffer.

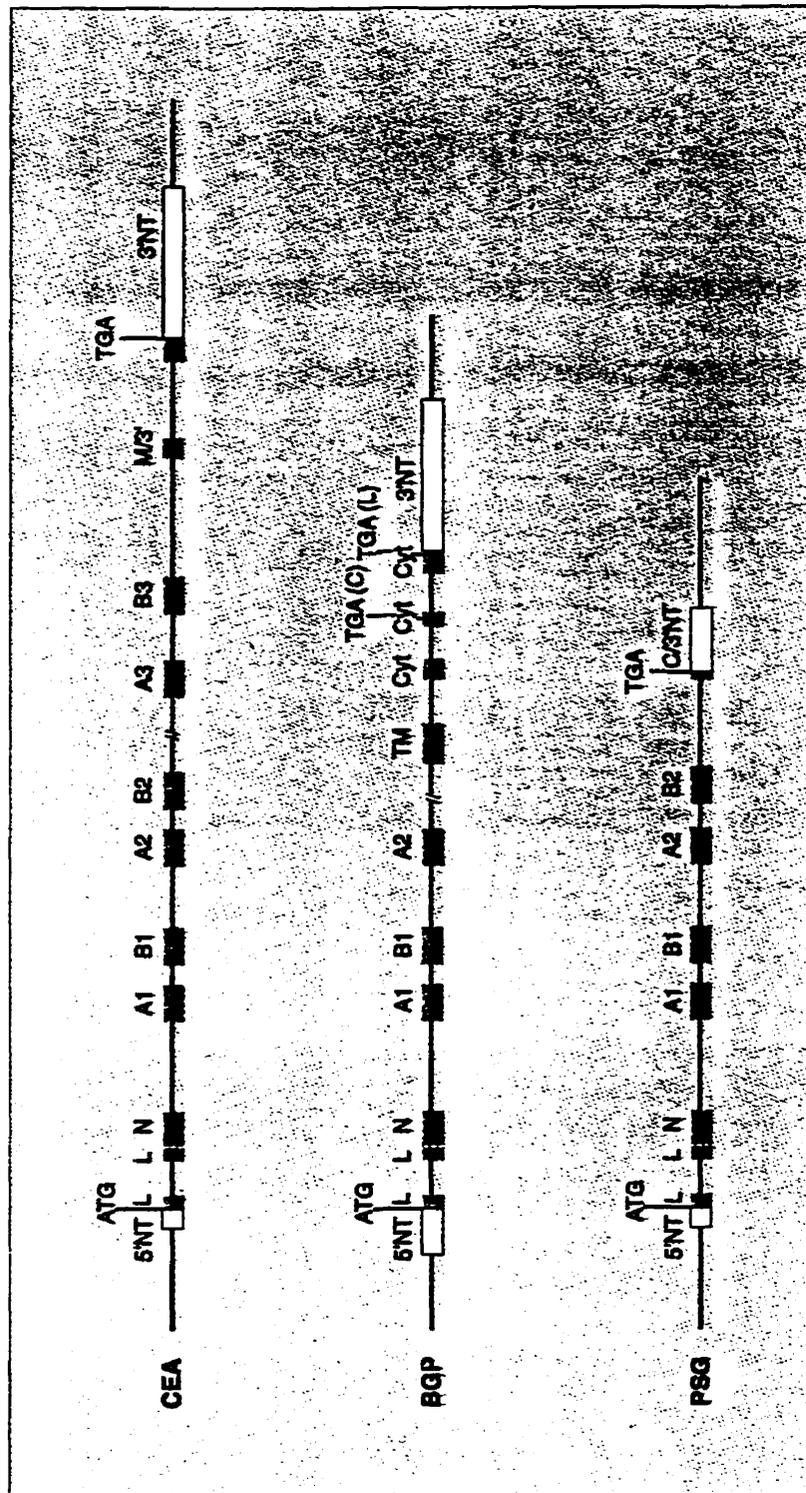
Figure 6. **Modèle illustrant le mécanisme possible de transduction de signal par BGP.** BGP pourrait reconnaître son (ses) ligands sous forme monomérique ou en s'associant en dimères. Les ligands de BGP seraient eux-mêmes présentés soit à la surface d'autres cellules (non illustré) ou sécrétés par ces cellules. Ils se lieraient au récepteur BGP en monomères ou en dimères. Cette liaison ligand-récepteur induirait possiblement des changements conformationnels conduisant à la phosphorylation du domaine cytoplasmique (pY, PKC) et à l'association à des protéines cytoplasmiques telles la calmoduline (Cam) et la tyrosine phosphatase (SHP-1), résultant potentiellement en l'activation cellulaire (SIGNAUX).



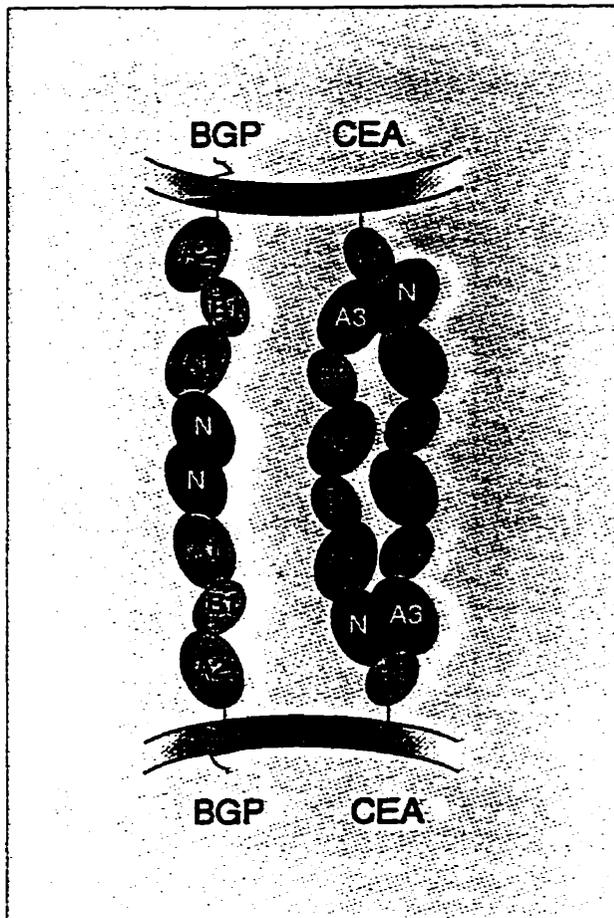
**Figure 1**



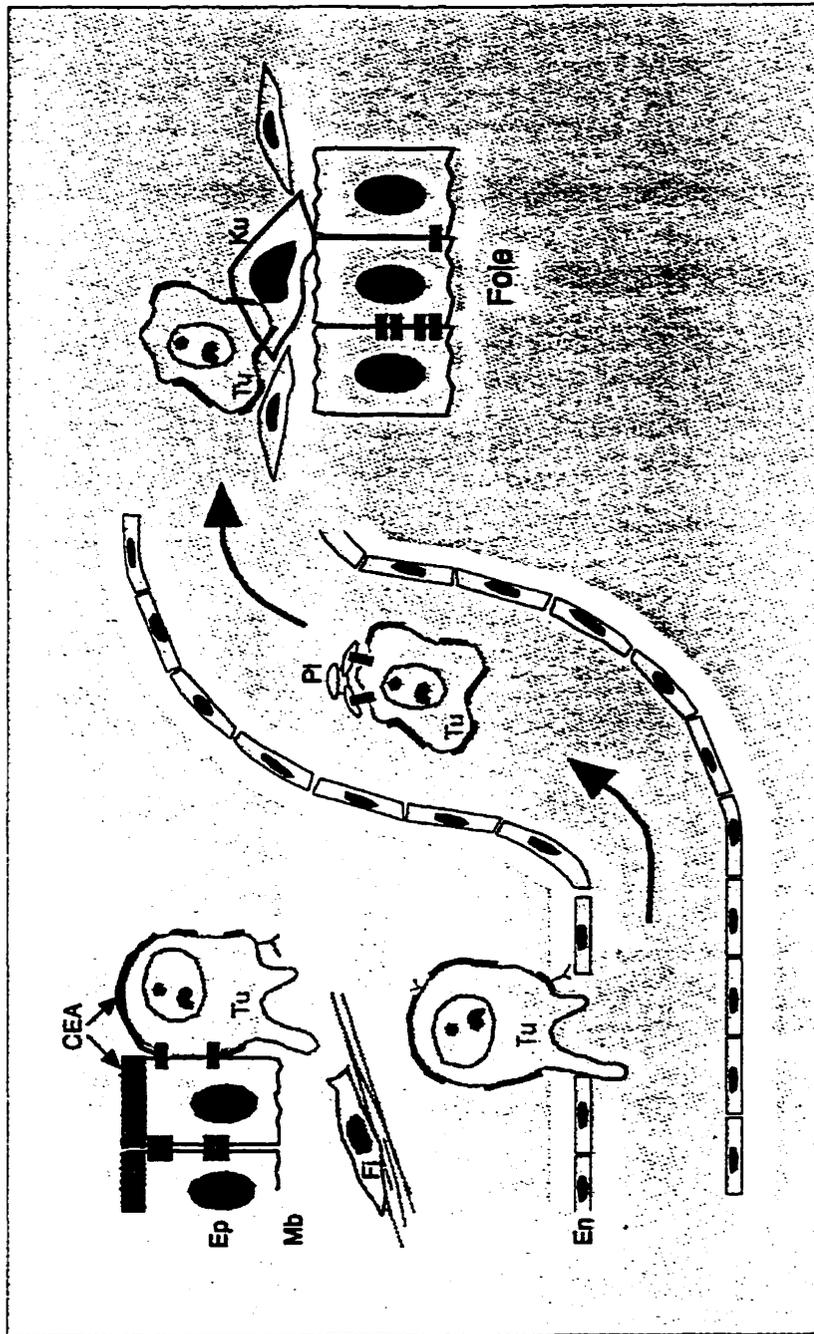
**Figure 2**



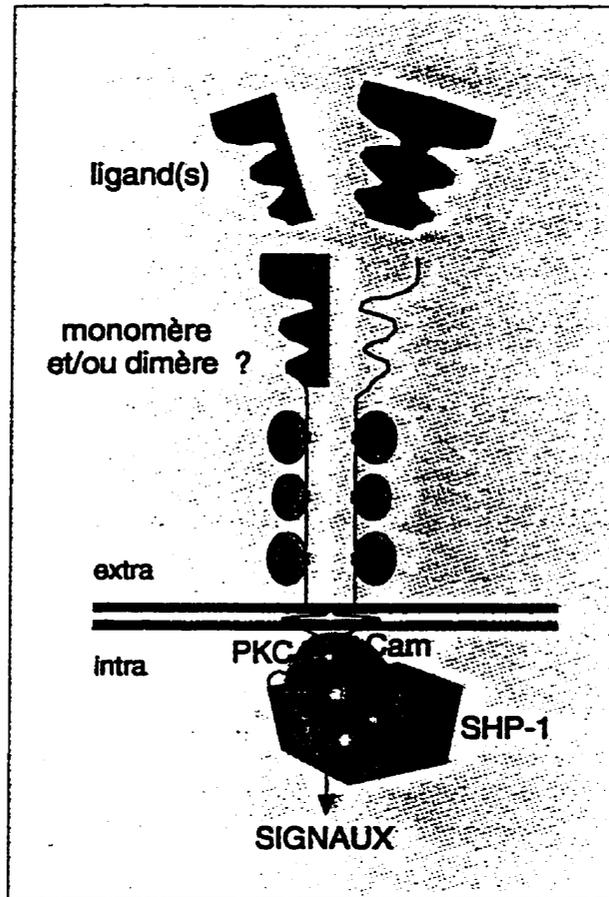
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

## CHAPITRE 2

### **BILIARY GLYCOPROTEIN 1 EXPRESSION DURING EMBRYOGENESIS: CORRELATION WITH EVENTS OF EPITHELIAL DIFFERENTIATION, MESENCHYMAL-EPITHELIAL INTERACTIONS, ABSORPTION AND MYOGENESIS**

Un manuscrit de Eugene Daniels, Stéphanie Létourneau, Claire Turbide, Ninel Kuprina, Tatiana Rudinskaya, A.C. Yazova, Kathryn V. Holmes, Gabriela S. Dveksler et Nicole Beauchemin publié dans la revue *Developmental Dynamics* 1996; 206: 272-90.

## PRÉFACE

Les expériences décrites dans ce chapitre ont pour but d'étudier le mode d'expression de *Bgpl* durant le développement embryonnaire de la souris. Ces données seront importantes pour l'élaboration d'une stratégie rationnelle pour évaluer le phénotype des souris *bgpl* -- quand celles-ci seront disponibles. Elles permettent également de formuler des hypothèses intéressantes quant à la fonction de *Bgpl*.

# Biliary Glycoprotein 1 Expression During Embryogenesis: Correlation With Events of Epithelial Differentiation, Mesenchymal-Epithelial Interactions, Absorption, and Myogenesis

EUGENE DANIELS, STEPHANIE LETOURNEAU, CLAIRE TURBIDE, NINEL KUPRINA, TATIANA RUDINSKAYA, A.C. YAZOVA, KATHRYN V. HOLMES, GABRIELA S. DVEKSLER, AND NICOLE BEAUCHEMIN

*Departments of Anatomy and Cell Biology (E.D.), Biochemistry (S.L., N.B.), Medicine (N.B.), and Oncology (N.B.), and the McGill Cancer Centre (S.L., C.T., N.B.), McGill University, Montreal, Canada H3G 1Y6; the Laboratory of Immunochemistry, Cancer Research Center, Moscow, Russia 115478 (N.K., T.R., A.C.Y.); and the Department of Pathology, U.S. Health Sciences University, Bethesda, MD 20814-4799 (K.V.H., G.S.D.)*

**ABSTRACT** Biliary glycoprotein (Bgp1), a carcinoembryonic antigen-related family member of the immunoglobulin superfamily, is involved in normal and neoplastic events. Analysis of Bgp1 expression throughout post-implantation mouse embryogenesis using reverse transcription-polymerase chain reactions, immunostaining with anti-Bgp1 monoclonal antibodies, and *in situ* hybridization with specific Bgp1 cDNA fragments revealed that Bgp1 may be involved in a number of specific embryonic processes. Immunoblot analysis of Bgp1 deletion mutant proteins indicated that distinguishable epitopes of the molecule were preferentially identified by the three Bgp1 antibodies used in this study. This distinction is supported by our immunolocalization studies during mouse embryogenesis in which the three antibodies revealed specific patterns of Bgp1 expression. Bgp1 is not expressed in early post-implantation embryos (7.5 dpc), but is found in the placenta and extra-embryonic tissues (decidual endothelial cells, giant trophoblasts, yolk sac visceral endoderm, and endometrial glands) at this time. The primitive gut epithelium and surface ectoderm were the first embryonic tissues to express Bgp1. Significant Bgp1 expression was also observed later during epithelial-mesenchymal interactions (skin, meninges, lung, kidney, salivary glands, pancreas). A unique epitope of Bgp1, detectable by the monoclonal antibody CC1, was also associated with mesenchymal expression and was prominent during myogenesis (secondary myotube formation) at sites of terminal differentiation. These studies suggest multiple roles for isoforms and glycoforms of the Bgp1 proteins localized in specific sites during prenatal development. © 1996 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** Carcinoembryonic antigen, CEA, Biliary glycoprotein, BGP or Bgp, C-CAM, Mouse embryogenesis, Myogenesis, Intestine, Adhesion, Placenta

## INTRODUCTION

The biliary glycoproteins (BGPs or Bgps) are members of the carcinoembryonic antigen gene family. Carcinoembryonic antigen (CEA) is a heavily glycosylated protein used clinically as a human tumor marker (Gold and Freedman, 1965). The CEA gene and cDNAs were characterized in 1987 and shown to encode a protein with typical immunoglobulin (Ig) features; the N-terminal domain resembles the variable-like Ig region and the internal repeating domains are C2-set Ig domains (Beauchemin et al., 1987; Thompson et al., 1991). Since the cloning of the CEA gene, 29 other human CEA-related genes, located on human chromosome 19 at position 19q13.1-3, have been identified (Thompson et al., 1991; Olsen et al., 1994). BGP represents one of the few members of this family to encode a cytoplasmic domain (defining short 10 amino acid- or long 73 amino acid-tailed isoforms) (Barnett et al., 1989, 1993; Drzeniek et al., 1991).

BGP was originally shown to be expressed in normal human gallbladder mucosa and at the bile canalicular surface of hepatocytes (Svenberg, 1976). However, expression studies have revealed that BGP is more widely distributed and found in various epithelia (both simple and stratified), in endothelia of capillaries, small arteries and veins, and in megakaryocytes, platelets, polymorphonuclear leukocytes, in a subset of mononuclear leukocytes, and in B cells and macrophages (Öbrink, 1991; McCuaig et al., 1992; Coutelier et al., 1994). The nomenclature in this field is confusing; rat and mouse BGP homologs have been identified and are called either C-CAM (Aurivillius et al., 1990), ecto-ATPase (Lin and Guidotti, 1989), or mouse Bgps (formerly identified as mmCGM1, Beauchemin et al., 1989; Turbide et al., 1991; McCuaig et al., 1992, 1993).

We and others have demonstrated that the human,

Received October 30, 1995; accepted January 19, 1996.

Address reprint requests/correspondence to Nicole Beauchemin, McGill Cancer Centre, McGill University, 3655 Drummond St., Montreal, Canada, H3G 1Y6.

mouse, and rat *Bgp* isoforms act as cell adhesion molecules (Ocklind and Öbrink, 1982; Aurivillius et al., 1990; Rojas et al., 1990; Turbide et al., 1991; McCuaig et al., 1992; Oikawa et al., 1992; Cheung et al., 1993). The rat *BGP* homolog exhibiting a 71 amino acid cytoplasmic domain (Cell-CAM 105, renamed C-CAM1) also serves as a bile acid transporter and an ecto-ATPase (Sippel et al., 1993; Lin and Guidotti, 1989). In addition, the rat C-CAM1 or pp120 has been characterized as an endogenous tyrosine phosphorylation substrate of the insulin receptor tyrosine kinase (Margolis et al., 1988; Najjar et al., 1995). The cytoplasmic (intracytoplasmic tail [IT] domain has also been implicated in the binding of calmodulin (Blikstad et al., 1992; Edlund et al., 1993).

Although only one *BGP* gene exists in humans (Thompson et al., 1991), two homologous mouse *Bgp* genes have been characterized (Nédellec et al., 1994, 1995). The *Bgp1* and *Bgp2* genes share a high degree of sequence homology in their promoter and coding regions as well as some common sites of expression. Dveksler et al. and Nédellec et al. have demonstrated that several mouse *Bgp1* isoforms and the *Bgp2* gene product function as mouse hepatitis virus receptors (MHVR) (Dveksler et al., 1991; Nédellec et al., 1994).

We have previously reported on the expression of *Bgps* during mouse embryonic development using Northern analyses and in situ hybridization (Huang et al., 1990). In light of the finding of novel *Bgp* genes, we have readdressed this question using more specific techniques such as reverse transcription-polymerase chain amplification (RT-PCR), immunostaining with anti-*Bgp1* monoclonal antibodies, and in situ hybridization with specific *Bgp1* fragments.

Fluctuations in *Bgp1* expression occur in normal as well as neoplastic events (Rosenberg et al., 1993), yet its role(s) remain unclear. In order to determine such function(s), we have identified the developmental periods exhibiting *Bgp1* protein expression as well as *Bgp1* organ-specificity. Mutant and deletion *Bgp1* proteins allowed us to distinguish different forms of these proteins detectable by monoclonal and polyclonal antibodies. Immunocytochemical studies on mouse embryos revealed patterns of *Bgp1* protein expression which are localized during gut and skin morphogenesis, epithelial-mesenchymal interactions, at sites of reabsorption, and during myogenesis.

## MATERIALS AND METHODS

### Mouse Embryos and Tissues

Staged embryos and fetuses (Theiler, 1972) were retrieved from mated BALB/c mice (Charles River, St.-Constant, Quebec, Canada). Noon on the day of appearance of the vaginal plug is considered 0.5 day post coitum (dpc). Adult mouse tissues were dissected from adult female mice of 6 weeks of age and either flash-frozen on dry ice or fixed for 18 hr in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 and dehydrated in graded ethanol before being embedded

in paraffin. Embryos and fetuses of 7.5 to 18.5 dpc were fixed as above. Serial sections were mounted on Tessa-prepared slides, dried for 18 hr at 37°C, and stored at 4°C in airtight boxes.

### RNA Preparation and Northern Analyses

Total RNA was essentially prepared as described in Huang et al., 1990 and Rosenberg et al., 1993. Briefly, embryos and tissues were collected and powdered using a mortar and pestle kept at -40°C. The powder was dissolved in a solution containing 4.0 M guanidium isothiocyanate (Chirgwin et al., 1979). Total RNA was extracted after centrifugation over a CsCl cushion. Northern analysis was performed as described previously (Huang et al., 1990). The RNA was transferred to a Hybond-N membrane and probed with  $5 \times 10^6$  cpm/ml of a random-primed,  $^{32}\text{P}$ -labelled (Feinberg and Vogelstein, 1983) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) probe. The concentration of RNA was first determined by measuring the absorbance at 260 nm, then confirmed by radioactive quantification of the G3PDH probe on a Fuji Bas 2000 BioAnalysing system (Stamford, CT).

### RT-PCR

Samples of 10  $\mu\text{g}$  of total RNA from either adult mouse colon or mouse embryos were submitted to RT in a total volume of 40  $\mu\text{l}$  in conditions described previously using a 21-mer oligonucleotide (KM5: 5'-TT-GATACCTCACTCTCAGCCA-3') located in the 3' untranslated region of the *Bgp1* and *Bgp2* cDNAs (McCuaig et al., 1993; Nédellec et al., 1994). Tandemly, 1  $\mu\text{g}$  of total RNA from each sample was also submitted to reverse transcription in a total volume of 25  $\mu\text{l}$  using a 20-mer antisense G3PDH oligonucleotide (5'-CAA-AGTTGTCATGGATGACC-3'). A fraction of the reverse-transcribed cDNA (1/4 for *Bgp1*, 1/2 for G3PDH) was submitted to PCR using Vent DNA polymerase with primers R46N1 (5'-CCAAATGATCACCATGAG-3', specific to the *Bgp1* cDNA) and KM6 (5'-GGC-TCCAGGATCCACCTTTTCTTC-3', specific for *Bgp1* and *Bgp2* cDNAs) or the same antisense G3PDH oligo combined with a sense oligo (5'-CCATGGAGAAGGC-TGGGG-3') (Dveksler et al., 1992). The reactions were incubated at a denaturing temperature of 94°C for 40 sec, an annealing temperature of 50°C for 2 min, and an elongation temperature of 72°C for 3 min for 30 cycles (*Bgp1*) or 20 cycles (G3PDH). Using the R46N1 and KM6 oligos, only *Bgp1* cDNAs are amplified as determined by DNA sequencing and hybridization results (Fig. 1B).

### Southern Analyses

cDNA fragments from RT-PCR reactions were electrophoresed in 0.8% agarose gels and then transferred to GeneScreen Plus (NEN Dupont, Lachine, Québec) membranes which were submitted to hybridization at 37°C for 18 hr with  $5 \times 10^6$  cpm of  $^{32}\text{P}$ -labelled oligonucleotides specific to the A2 domain of the *Bgp1*

cDNA (KM4: 5'-ACACAAGGAGGCCTCTCAGATG-GC-3'), the A2 domain of the *Bgp2* cDNA (A2N $\alpha$ : 5'-AACAAATGATACTCTTCTAATC-3') (Nédellec et al., 1994), or to G3PDH (5'-CTAAGCAGTTGGTGGTGC-3') using conditions defined in McCuaig et al., 1993. Membranes were washed to a final stringency of  $1 \times$  salt sodium citrate (SSC) containing 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) at 50°C or 65°C for 20 min. Specificity of amplifications, hybridizations, and stringency of washes were ensured by including the *Bgp1* and *Bgp2* cDNAs in the Southern analysis (Fig. 1B). Fragments were also cloned and sequenced according to standard protocols (Sambrook et al., 1989) to confirm their identity. The radioactive quantification of each fragment was performed on a Fuji Bas 2000 BioAnalysing system.

#### Construction and Expression of *Bgp1* cDNA Mutants

The *BgpA*, *BgpC*, *BgpD* and *BgpG* cDNAs are natural splice variants of the *Bgp1* gene cloned from either CD-1 or BALB/c mice (Dveksler et al., 1991; McCuaig et al., 1993). Construction of deletion mutants  $\Delta 206-381$ ,  $\Delta 108-381$ ,  $\Delta 50-293$  of the *BgpA* cDNA has previously been reported (Dveksler et al., 1993, 1995). Point mutations that eliminated each of the three N-linked glycosylation sites in the N-terminal domain of *BgpA*, either separately or in combinations, were obtained by replacing asparagine with glutamine residues at positions 37, 55, and 70 by the site-directed method described by Ho et al., 1989 and Dveksler et al., 1995. The mutated cDNAs were cloned into the pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA) under the T7 promoter and protein was obtained after transfection of baby hamster kidney (BHK) cells and infection with vaccinia virus  $\sqrt{TF7-3}$  as described previously (Dveksler et al., 1993, 1995; Nédellec et al., 1994). Stably transfected BHK cells were generated by electroporation of plasmids containing these cDNAs driven by the Rous sarcoma viral (RSV) promoter as well as a pRSVneo plasmid (Dveksler et al., 1991). Selection was performed in G418-containing medium (Dveksler et al., 1995).

#### Antibodies and Immunoblot Analyses

Preparation and characterization of the CC1 and AgB10 monoclonal antibodies have been described previously (Smith et al., 1991; Kuprina et al., 1990). The mouse CC1 monoclonal antibody (mAb) was raised to the mouse hepatitis virus receptor (identical coding region to *BgpA* [McCuaig et al., 1992]) purified from BALB/c liver membranes (Williams et al., 1990; Dveksler et al., 1993). The rat mAb AgB10 was raised against C57Bl/6 ghost of hepatocytes (Kuprina et al., 1990). A polyclonal antibody raised to the CD1 mouse colon 120 kDa *Bgp1* protein (serum 231) (McCuaig et al., 1992) was also used. For immunoblot analyses, protein lysates were prepared from *Bgp*-expressing NIH 3T3 transfectant cells (Rosenberg et al., 1993) or from BHK-transfected or vaccinia-infected cells (Dveksler et

al., 1993) as described previously. To deglycosylate *Bgp* proteins, *BgpA*- and *BgpD*-transfectant cell lysates were treated with N-glycanase at 37°C for 18 hr (0.6 units of N-glycanase/200  $\mu$ g protein lysates) in a buffer recommended by the supplier (GenZyme Corp., Cambridge, MA). The proteins were separated on 8% or 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels and transferred to Immobilon membranes. *Bgp1* proteins were detected using a 1:1000 dilution of the 231 polyclonal serum, a 1:500 dilution of the CC1 mAb, or a 1:50 dilution of AgB10 mAb hybridoma supernatants. Detection of first antibodies was performed with either a rabbit anti-mouse (CC1) or a rabbit anti-rat (AgB10) antibody (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) and proteins were revealed with  $^{125}$ I-labelled protein A (Amersham, Chicago, IL). Monoclonal mouse anti-swine desmin (DE-R-11, DAKO Corp., Santa Barbara, CA) reacts with the 53 kDa intermediate filament protein desmin in muscle cells. This antibody shows broad interspecies cross-reactivity, which includes mouse (Rudnicki et al., 1993).

#### Cytofluorometric Analyses

*Bgp1*-expressing cells were analyzed by cytofluorometry with the AgB10 mAb or the 231 polyclonal antibody and fluorescein-conjugated, affinity-purified goat anti-rat or anti-rabbit IgG Fab<sub>2</sub> fragments (Cappel, West Chester, PA) using a FACScan program on a Becton Dickinson analyser (San Jose, CA).

#### Immunostaining

Immunostaining experiments were performed using the antibodies described above. Deparaffinized sections

Fig. 1. Amplification of *Bgp1* cDNAs from colonic and embryonic sources. A: DNA from fragments numbered in panel C were cloned, sequenced, and shown to correspond to the splice variants of the *Bgp1* mRNA. The small arrows correspond to the *Bgp1*-specific oligonucleotides R46N1 and KM6 used to PCR amplify the cDNAs. The large arrow above the A2 domain corresponds to oligonucleotide KM4 used in the hybridization of Southern blots. B: 200 ng of plasmids containing either the *Bgp1* or *Bgp2* cDNAs was submitted to PCR amplifications (lanes 1 and 2) using oligonucleotides specific for the *Bgp1* cDNA (left panel) or the *Bgp2* cDNA (right panel). Full-length *Bgp1* (lanes 3) or *Bgp2* cDNAs (lanes 4) were also included as controls for hybridizations. C: 10  $\mu$ g of total RNA was subjected to reverse transcription with an oligonucleotide specific to the 3' untranslated region (UT) of the *Bgp1* mRNA (KM5), and the resulting cDNAs were PCR amplified with another 3' UT oligonucleotide (KM6) as well as an oligonucleotide specific to the N-terminal domain of the *Bgp1* mRNA (R46N1). The PCR products were separated on a 0.8% agarose gel, transferred to a GeneScreen Plus membrane, and probed with a  $^{32}$ P-labelled KM4 oligonucleotide, specific for the *Bgp1* A2 domain. Specificity controls included the *BgpD* and *Bgp2* cDNA fragments, shown in panel B. Fragment 3 was a single-stranded DNA. D: 1  $\mu$ g of total RNA from colon and embryos was submitted to reverse transcription and PCR amplification using oligonucleotides specific for G3PDH. The radioactive G3PDH bands were quantified on a BAS 2000 BioAnalyser and fold expression was calculated relative to the 12.5 dpc embryo cDNA. E: Radioactive fragments 1 + 2 and 4 + 5 were quantified on a BAS 2000 BioAnalyser and these counts were corrected for fold expression of the G3PDH.

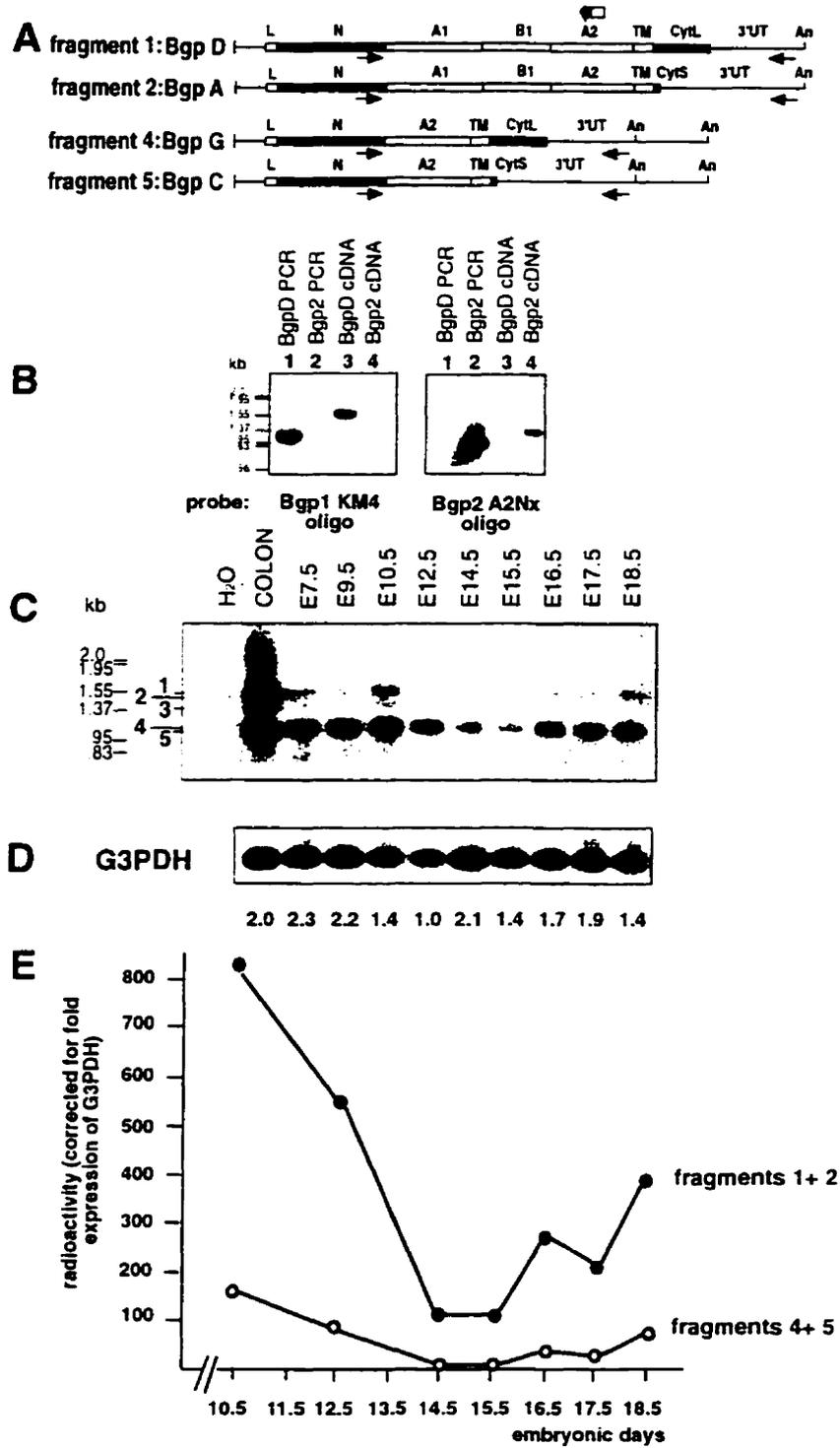


Fig. 1.

were incubated in a methanol-hydrogen peroxide solution for 40 min to block endogenous peroxidase. Non-specific binding of dilute concentrations of primary antibody was blocked by preincubation of sections in 0.1% albumin followed by preimmune serum corresponding to the secondary antibody selected. Sections were incubated for 18 hr at 4°C in dilute concentrations (1:250 to 1:1000) of the unconjugated primary antibody (concentration of the 231 IgG fraction: 7.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; AgB10 IgG fraction: 0.56  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; CC1 IgG fraction: 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Parallel incubations of sections in Tris buffer without primary antibody were included as well as incubations of control sections with preimmune sera of rabbit, rat, or mouse, respectively, or an irrelevant IgG1 monoclonal antibody. Following washes in Tris buffer, the sections were then incubated in an excess of linking secondary antibodies (231: swine anti-rabbit IgG from Dako Corp. at 1:50 dilution, AgB10: rabbit anti-rat IgG and CC1: rabbit anti-mouse IgG from Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, both at a 1:50 dilution) for 30 min at 20°C. Finally, the soluble peroxidase-antiperoxidase complex (1:250) was added for 30 min at room temperature. A DAB reaction (3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma, St. Louis, MO) was developed, followed by an amplification procedure with copper sulfate.

#### In Situ Hybridization

Six  $\mu\text{m}$  serial sections of paraffin-embedded embryos were deparaffinized, rehydrated, and post-fixed in 4% paraformaldehyde, pH 7.4 at 4°C and submitted to in situ hybridization. The sections were permeabilized in proteinase K (3.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 50 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0) followed by another post-fixation in paraformaldehyde. Sections were incubated in a prehybridization solution (5  $\times$  SSC, 5  $\times$  Denhardt's, 50% deionized formamide; 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tRNA and diethylpyrocarbonate [DEPC]-treated  $\text{H}_2\text{O}$ ) for 1.5 hr at 42°C, followed by hybridization in the same solution but containing denatured probes at preselected concentrations. A 169 bp *Bgp1*-specific *Fnu4HI* fragment located in the N-terminal domain was cloned into a Bluescript SK+ plasmid and sense and antisense RNA probes were generated after linearization of the template plasmid and transcription by either the T3 or T7 RNA polymerases (Pharmacia, Montreal, Québec). The *Bgp1 Fnu4HI* fragment has previously been shown to hybridize only to the *Bgp1* gene in genomic Southern analyses using the same washing stringencies (Nédellec et al., 1995). Furthermore, we have confirmed using RNase protection assays (data not included) that the *Bgp1 Fnu4HI* riboprobe will not hybridize to in vitro-transcribed *Bgp2* or *Cea10* mRNAs. The digoxigenin-labelled RNA probes were prepared and evaluated according to instructions provided by the manufacturer (Boehringer-Mannheim, Montréal, Québec). Hybridization in humid chambers was at 42°C for 18 hr. After appropriate washing of the sections to a final stringency of 0.1  $\times$  SSC at 50°C, the digoxigenin-labelled

probes were visualized through reactions with alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin Fab<sub>2</sub> fragment using protocol buffers (Boehringer Mannheim detection kit), but containing 1 mM levamisole. The color reaction, which produced a deep blue precipitate at the hybridization site, was obtained by incubation for a restricted time in a solution of nitroblue tetrazolium and X-phosphate (Boehringer Mannheim) in a dark, humid chamber.

## RESULTS

### Expression of *Bgp1* mRNAs During Embryonic Development

Since the original characterization of the *BgpA* cDNA, many other splice variants of the *Bgp1* gene and two other mouse *Bgp*-related genes have been identified (McCuaig et al., 1993; Nédellec et al., 1994, 1995; Keck et al., 1995). The two new genes share with the *Bgp1* gene highly homologous N-terminal domains. These two genes are, respectively, predominantly expressed in adult kidney (Nédellec et al., 1994) and placenta (Keck et al., 1995), although low expression of the *Bgp2* and *Cea10* genes has been detected in other tissues. The *Bgp1* gene is most abundant in adult intestine and liver (McCuaig et al., 1992; Nédellec et al., 1995). We therefore evaluated the expression of *Bgp1* mRNAs during embryonic development. Because of the very high similarity of the *Bgp1* and *Bgp2* A1, B1, and A2 exons (>95%), a quantitative RT-PCR approach was best suited to guarantee specificity of amplifications and hybridizations. The *Bgp* RNAs were reverse transcribed using an oligonucleotide hybridizing in the 3'UT and the specificity of PCR amplification was conferred by an oligonucleotide in the *Bgp1* N-terminal domain. As can be seen in Figure 1A, the chosen strategy favours amplification of splice variants with either two or four Ig domains, as well as that of cDNAs encompassing both a shorter (10 amino acids) or longer (73 amino acids) cytoplasmic tail (McCuaig et al., 1993). Using this oligo combination, only the *Bgp1* cDNA was amplified (Fig. 1B, left panel, lanes 1 and 2), while another combination of oligonucleotides was specific in amplifying the *Bgp2* cDNA (Fig. 1B, right panel, lanes 1 and 2). Similarly, hybridization of the Southern blot with the *Bgp1* KM4 oligo detected only the *Bgp1* PCR fragment (Fig. 1B, left panel, lane 1) or the full length cDNA (lane 3), while hybridization of the A2Nx oligo detected only the *Bgp2* fragments (Fig. 1B, right panel, lanes 2 and 4). When RNA from adult colon was used in this assay, several distinct fragments were detected (Fig. 1C). Fragments 1, 2, 4, and 5 (Fig. 1A,C) were cloned and their DNA sequences corresponded to that of *BgpD*, *BgpA*, *BgpG*, and *BgpC* cDNAs, respectively (McCuaig et al., 1993). Fragment 3 represented single-stranded DNA, since it was degraded upon treatment with T4 DNA polymerase. The identity of the 2.0 kb fragment present in the amplification of the colon cDNA is presently unknown.

When RNA from embryos was submitted to RT-PCR

(Fig. 1C), the same fragments were detected. Fragments 4 and 5 were the most abundant, while fragments 1 and 2 were present in amplification of all embryonic cDNAs, albeit in significantly reduced amounts. Two and four Ig domain *Bgp1* mRNAs were also detected in 7.5 and 9.5 dpc embryos, but this expression most likely corresponded to maternal RNA; some maternal tissue was dissected with the embryos of these stages, and no *Bgp1* protein was detected in the embryo by immunostaining with three *Bgp1* specific antibodies (see below). For quantification purposes, the same RNAs were submitted to reverse transcription and PCR amplification with G3PDH oligonucleotides and the resulting fragments were quantified using a Bas 2000 BioAnalyser after Southern analyses (Fig. 1D). *Bgp1* fragments were similarly quantified and the counts were corrected according to the fold expression of G3PDH. As can be seen in Figure 1E, *Bgp1* mRNA transcription is most prevalent between 10.5–12.5 dpc and 16.5–18.5 dpc of mouse embryonic development. Two and four Ig domain mRNAs are also expressed coordinately during these periods.

#### Antibody Characteristics and Specificity

Three antibodies were used to define the *Bgp1* embryonic expression patterns. Since these antibodies were raised against *Bgp* proteins prepared from three different sources, we first defined which epitopes of the *Bgp1* protein were recognized and whether their reactivity was dependent upon N-linked glycosylation of the proteins. The 231 polyclonal antibody was raised against a p120 *Bgp* protein purified from adult CD1 mouse colon. This antibody has been shown to inhibit *Bgp1*-dependent intercellular adhesion in aggregation assays (McCuaig et al., 1992). When total cellular proteins of transfectant cells expressing *Bgp* or *Bgp*-deletion constructs were analyzed by immunoblot analysis, the 231 antibody detected *Bgp1* proteins from all constructs whether fully glycosylated or not. The *Bgp2* protein or proteins from control transfectant cells were not detected by this antibody (Fig. 2A,F,G). The faint 64 kDa band appearing in all lanes on the 231 immunoblot was present in extracts immunoblotted with a preimmune serum, as previously described (Rosenberg et al., 1993).

The CC1 monoclonal antibody, raised against Swiss-Webster liver p110 *Bgp* proteins (Williams et al., 1990), reacted against most *Bgp1* proteins whether they were secreted from BHK cells (such as R111) or were membrane anchored (such as *BgpA*, *BgpD*, or deletions thereof) (Fig. 2B,F,G). However, proteins from three *Bgp1* constructs were negative in CC1 immunoblots. Part of the epitope recognized by the CC1 antibody is considered to lie within the last 57 amino acids of the N domain as noted previously by Dveksler et al., 1993. This is also confirmed in our study since the *BgpC* protein is positive for CC1 reactivity while a deletion protein lacking the last 57 amino acids of the N

domain ( $\Delta 50-293$ ) failed to react with the CC1 antibody. Furthermore, this epitope may be dependent upon the conformation of the protein or the N-linked glycosylation (Williams et al., 1990) of the second, third, and fourth Ig domains of the protein since N-glycanase treatment abolished CC1 reactivity (Fig. 2B, F,G: *BgpA* or *BgpD* deglycosylated), but mutations of N-glycosylation sites within the first Ig domain had minimal effect on binding of this antibody to the denatured protein (Fig. 2B,F,G:  $\Delta$ glycos. 1,2 and  $\Delta$ glycos. 1,2,3).

The third antibody, AgB10 mAb, was raised against C57Bl/6 ghosts of hepatocytes and was reactive against fully glycosylated *BgpA* or *BgpD*, but was negative for the same proteins submitted to N-glycanase treatment (Fig. 2C,F,G). The 85 kDa protein band detected in the deglycosylated *BgpD* lane (Fig. 2C) does not correspond to the deglycosylated 58 kDa protein seen in Figure 2A and may be a degradation product. The AgB10 antibody also recognized proteins expressed from constructs mutated in the first two or three N-linked glycosylation consensus sequences in the N-terminal domain (Fig. 2C,F,G:  $\Delta$ glycos. 1,2 and  $\Delta$ glycos. 1,2,3), suggesting that its epitope is either conformational or involves sugar moieties in the second, third, and fourth Ig domains of *Bgp1*. The only other mutant protein recognized by the AgB10 antibody is that expressed by the  $\Delta 206-381$  construct which encompasses the N and A1 domain (Fig. 2C). This result suggested that the epitope recognized by AgB10 lies within the A1 domain. Immunoprecipitation experiments performed with the AgB10 on fully glycosylated *BgpA* and *BgpC* transfectant cell lysates suggested that the epitope reactive with this antibody required the A1 domain since the *BgpC* protein was not immunoprecipitated by the AgB10 antibody but was recognized readily by the 231 antibody (Fig. 2D). To assess whether the AgB10 antibody reactivity was dependent upon the native conformation of the *Bgp1* proteins, cytofluorometric analyses were performed on transfectant cells bearing the *BgpA* or *BgpC* proteins expressed at the cell surface. As seen in Figure 2E, the polyclonal 231 antibody readily detected the *Bgp1* proteins at the surface of the transfectant cells, whereas the AgB10 mAb recognized only the *BgpA* protein, suggesting that either its epitope lies within the A1 domain or that it requires a particular conformation imprinted on the protein by the folding of the A1 domain. Although none of these antibodies cross-reacted with the *Bgp2* protein, as determined in Figure 2A–D, we have previously shown that the *Bgp2* protein is expressed in this same transfectant cell line since the mouse hepatitis virus specifically bound to these transfectant cells and not to control transfectant cells (Nédellec et al., 1994).

AgB10 was confirmed to specifically stain adult bile canaliculi (Fig. 3A) as well as the brush border zone of the small intestine (Fig. 3B). Antibody 231 stained the apical surfaces of gut epithelia and mucus-secreting cells (Fig. 3C).

### Immunocytochemical Localization in Embryos and Fetuses

The immunocytochemical reactions of the three antibodies in BALB/c mouse embryos (7.5 to 18.5 dpc) were examined in a temporal sequence, 1) identifying the order and duration of tissue reactions and 2) comparing the unique and co-localization characteristics of the three antibodies.

No immunoreactivity was observed in tissues exposed to PBS, non-immune sera, or to an irrelevant IgG1 mAb, nor when the secondary antibody was omitted. Non-specific pseudoperoxidase reactions in red blood cells (RBC) were completely inhibited in our protocol, as demonstrated in all figures. Occasionally, a faint, non-specific DAB reaction was noted in the visceral yolk sac endoderm. This reaction is not unexpected since immunoglobulin is actively absorbed through these cells (Haar and Ackerman, 1971) to provide passive immunity to the fetus. The significant staining reactions were uniform, intense reactions localized throughout the apical membrane of endodermal cells (Fig. 8A,B).

Table 1 summarizes the immunoreactions observed at two selected periods of development (10.5 and 15.5 dpc). After comparison of immunoreactions for each day (7.5 to 18.5 dpc), the two selected gestational days shown are representative of major fluctuations in Bgp protein expression.

### Earliest Bgp1 Protein Expression in the Conceptus

The early post-implantation embryo (dpc 7.5) showed no detectable expression of the Bgp1 proteins in the primary germ layers or extra-embryonic tissues when stained with antibodies CC1, AgB10, or 231 (Fig. 3E). The trophoblast cells and primitive visceral yolk sac showed no specific reaction. The maternal blood vessels in the decidua, however, demonstrated strong staining of the endothelium with antibody 231 (Figs. 3E,F and 4B,C). In sharp contrast to that seen in 10.5 dpc control sections, the maternal endothelium in the decidua showed considerable strong cytoplasmic and surface staining with antibody 231 which was observed throughout the embryonic and fetal periods (Fig. 4B,C). Numerous small mononuclear cells were identified in intimate contact with the thick endothelium (Fig. 4C). Similar 231-positive high endothelium with adherent mononuclear cells were seen in the 12.5 dpc decidua. The maternal endothelium in the decidua showed no detectable reaction with antibodies CC1 and AgB10.

To confirm this expression pattern, in situ hybridization was performed on alternate sections. Endothelial cells in the decidua of 10.5 dpc and 12.5 dpc embryos showed a positive reaction for *Bgp1* mRNA (data not shown), supporting the observation of Bgp1 expression with the 231 antibody.

Table 1 shows the temporal pattern of Bgp1 expres-

sion by trophoblastic cells in the early placenta. By 10.5 dpc gestation, a detectable reaction to antibody 231 was identified along the cell surfaces of polar trophoblast giant cells (Fig. 3F). In situ hybridization studies also showed that similar cells expressed *Bgp1* mRNA (Fig. 4A). Aggregates of spongiotrophoblasts (but not fetal mesenchyme or capillaries) in the labyrinthine placenta also expressed the *Bgp1* mRNA.

### Early Expression of Bgp1 by Embryonic Surface Ectoderm

Surface ectoderm expression of Bgp1 protein, as detected by antibody 231, was observed as early as 8.5 dpc of gestation (data not shown). The staining reaction of the entire developing epidermis with the antibody 231 increased in intensity from 8.5 dpc to 18.5 dpc (Fig. 5C). However, when skin appendages (hair anlage) began to develop, the discrete anlage were the only sites in the epidermis not to show a reaction against antibody 231 (Fig. 5C). To confirm this expression pattern, in situ hybridization was performed with a *Bgp1*-specific probe. These studies also demonstrated that while the entire epidermis expressed *Bgp1* mRNA, the ectodermal cells of the hair anlage showed no expression of *Bgp1* mRNA (Fig. 5A,B). As seen at higher magnification, while there was heavy labeling in the epidermis, the cytoplasm of basal cells and the most superficial layers of the epidermis showed minimal *Bgp1* mRNA (Fig. 5B).

**Fig. 2. Antibody reactivity.** A: Bgp1 transfectant or infectant cell protein lysates were separated on 8% or 10% SDS-PAGE gels and immunoblotted with a polyclonal antibody raised to the Bgp proteins (serum 231) or (B) with a monoclonal antibody (CC1) raised to the mouse hepatitis virus receptor or (C) with a monoclonal antibody (AgB10) raised to a Bgp antigen of bile canaliculi using conditions described in Materials and Methods. Numbers above the immunoblots refer to the cDNA constructs, depicted in panel F, used in the transfections or infections. The arrows in panel A point to Bgp protein bands from lysates submitted to N-glycanase treatment. D: The first five transfectant cell lysates indicated were immunoprecipitated with the AgB10 monoclonal antibody, while the last three lysates were immunoprecipitated with the 231 antibody. Immune complexes were denatured, then separated on an 8% SDS-PAGE gel; the proteins were transferred and immunoblotted with antibody 231. E: BgpA or BgpC transfectant cells were collected from the culture dishes and incubated with either the 231 polyclonal antibody or the AgB10 mAb. The complexes were then reacted with fluorescein-conjugated goat anti-rabbit or anti-rat IgG Fab<sub>2</sub> fragments and cytofluorometrically analysed. F: Graphic description of the cDNAs used for transfections or infections. The DNA sequences of the constructs can be found in McCuaig et al., 1993. The black dots correspond to mutations in the first two or three N-linked consensus glycosylation sites (Dveksler et al., 1995). BgpA or BgpD degl. represents protein lysates from BgpA or BgpD transfectant cells subjected to N-glycanase treatment. Δ206-381, Δ106-381, Δ50-293 correspond to deletion constructs and the numbers refer to the amino acid positions. L, signal sequence; N, N-terminal domain; A1, B1, A2, C2-set Ig domains; TM, transmembrane domain; CytS or CytL, intracytoplasmic domain short (10 amino acids) or long (73 amino acids). Constructs 5, 6, 8-11 have been described in Dveksler et al., 1993, 1995. G: Summary of antibody reactivity. + indicates a positive reaction; -, a negative reaction.

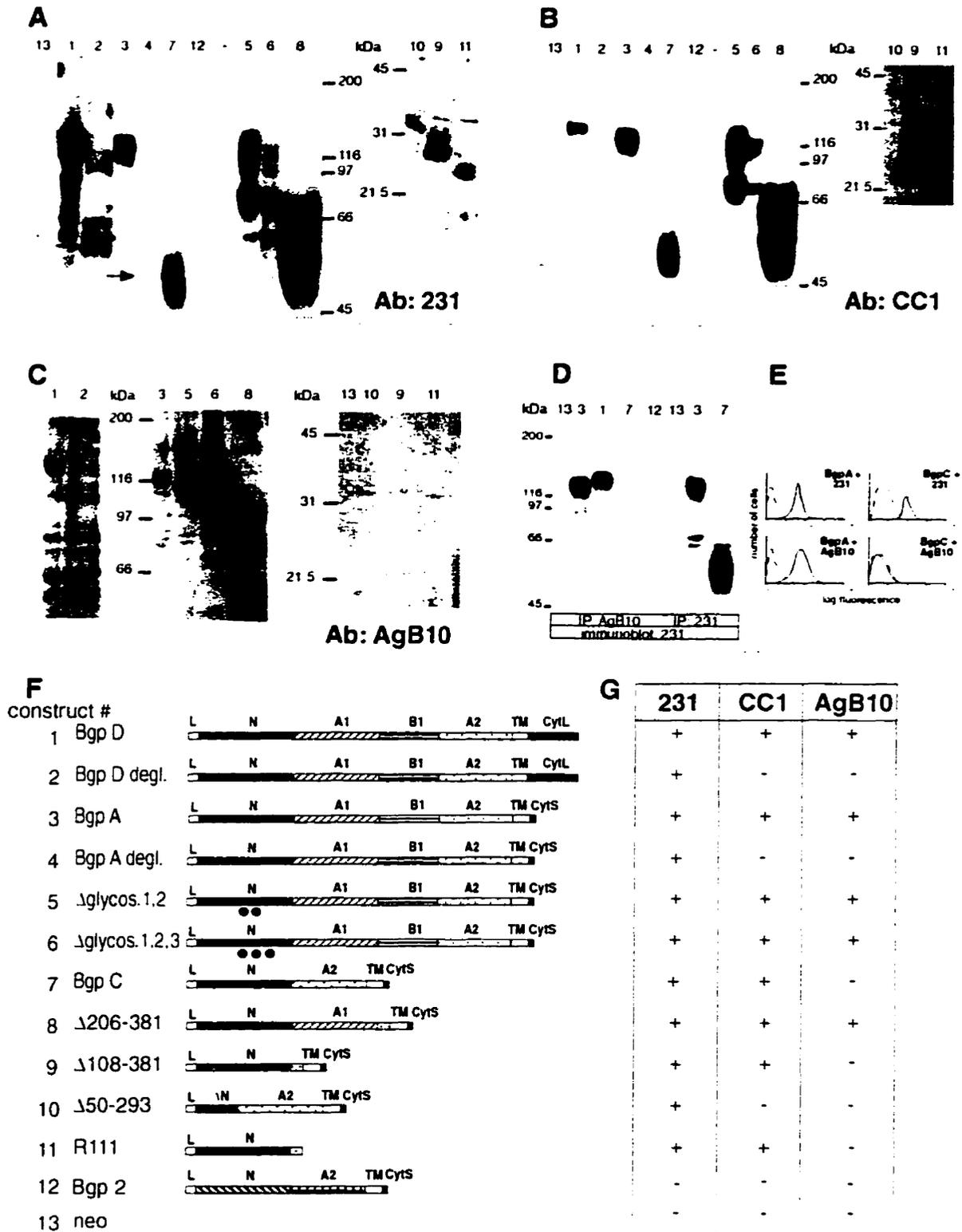


Fig. 2

### Bgp1 Expression in the Gut Endodermal Epithelium

The primitive endoderm showed no Bgp1 expression in 7.5 dpc embryos (Fig. 3E). By 10.5 dpc, the primitive gut endodermal layer stained strongly with antibody CC1 (Fig. 6A). A similar reaction in the primitive gut epithelium was observed with the monoclonal antibody AgB10. Table 1 summarizes the immunostaining characteristics of the developing gut. Figure 6B shows positive staining reactions to antibody 231 by the gut endodermal layers (stomach, duodenum, small intestine and large intestine). In the esophagus and herniated midgut loops, positively stained stratified epithelia were identified (not shown). Throughout the gut, the associated mesenchyme showed no reaction to any of the antibodies (Fig. 6A–D). In contrast, while pancreatic endoderm, fetal liver endoderm, or respiratory endodermal epithelia showed no Bgp1 expression, the closely associated mesenchyme in these organs showed positive reactions with the CC1 antibody (Fig. 7D,E). The only region of the gut epithelium which showed co-localization of all three antibodies was the multilayered rectal epithelium (Fig. 6D). This reaction was maintained late in fetal development, and the immunoreaction product was observed to outline the cells of the multilayered endodermal epithelium.

### CC1 Monoclonal Antibody Reacts With Developing Mesenchymal Tissues During a Period of Mesenchymal-Epithelial Interactions

Early embryonic mesenchyme (7.5–12.5 dpc) showed no reaction to antibody CC1. A detectable staining reaction in mesenchyme was evident during periods of active mesenchymal-epithelial interactions in 15.5 dpc meninges (Fig. 7A), dermis (Fig. 7B), salivary gland (Fig. 7C), lung (Fig. 7D), pancreas (Fig. 7E), as well as palatal shelf and metanephric kidney (data not shown).

### AgB10 Monoclonal Antibody Stains Specific Embryo Organs

In contrast to the staining reactions observed with antibodies CC1 and 231, both embryonic surface ectoderm and mesenchyme showed no reaction with mAb AgB10. Intense AgB10 staining reactions were identified early in the visceral yolk sac endoderm (Fig. 8A,B), followed at 15.5 dpc in the metanephric ductular epithelia (Fig. 8C), secretory and ductular epithelia of salivary glands (Fig. 8D), and nasal epithelia (data not shown). The developing fetal liver showed no definitive reaction as it displayed predominant hemopoietic activities. By 18.5 dpc gestation, AgB10-positive apical domains of hepatocyte membranes forming the bile capillary are detectable in mouse fetal liver (Shipova et al., 1988).

### CC1 Monoclonal Antibody Epitope Is Expressed at Sites of Active Myogenesis

During early phases of somite formation and differentiation of myotomes, no reaction could be obtained

with mAb CC1, AgB10, or 231. However, by 13.5 dpc, 14.5 dpc, and peaking at 15.5 dpc, CC1-positive, spindle-shaped cells could be identified at terminal sites of active myogenesis (intercostal muscles, diaphragm, subscapular muscles). Figure 9 illustrates the single spindle-shaped cells on large primary myotubes identified on 15.5 dpc sections. Figure 9A also illustrates various phases of apparent fusion of small CC1-positive cells (forming secondary myotubes) on the larger primary myotubes. These CC1-positive cells are clearly seen in cross sections of the diaphragm (15.5 dpc) where the intimate contact on the circumference of large primary myotubes is clearly evident (Fig. 9B).

Mesenchymal cells (precursors of fibroblasts) distributed between the developing primary and secondary myotubes (myofibers) showed no reactivity (Fig. 9B). Staining reactions of serial sections with the monoclonal antibody directed against the intermediate filament protein desmin, characteristic of myoblasts, clearly revealed that myoblast precursors (desmin-positive cells) showed no reactivity to CC1 in myotomes or during the migration phase (data not shown), but only at terminal sites of active myogenesis. Figure 9C illustrates desmin-positive cells on the surface of large primary myotubes seen at 15.5 dpc. These cells correspond to CC1-positive cells seen in Figure 9A.

### DISCUSSION

The three antibodies used in this study have highlighted certain similarities and differences in the Bgp1 expression pattern during embryogenesis. The three antibodies detected expression of Bgp1 in the yolk sac visceral endoderm, the uterine glands, and the epithelial lining of many tissues of endodermal lineage (Table 1). Although these antibodies exhibit distinct specificity for Bgp1 in immunoblot analyses (Fig. 2), at the present time we cannot entirely rule out the possibility that the differences in expression may reflect recognition of unspecific epitopes or that the antibodies may recognize epitopes of other members of the mouse *Cea* family. This is unlikely, however, since the antibody does not bind to the Bgp2 protein, which is its most closely related family member. The 231 polyclonal serum and CC1 monoclonal antibody were raised to a highly purified, denatured 110–120 kDa Bgp1 adult mouse colon and liver protein, respectively. The AgB10 monoclonal antibody was raised against partially denatured hepatocyte membrane proteins. The two monoclonal antibodies were prepared for studies intended for different functions, i.e., the CC1 mAb is an inhibitor of mouse hepatitis viral infection (Smith et al., 1990) and the AgB10 mAb recognizes a Bgp1 bile canaliculi protein (Kuprina et al., 1990). The Bgp1 epitopes recognized by the two monoclonal antibodies have been restricted in the present analysis and it is clear that these involve complex structural and conformational features which may or may not be selectively presented either in the native state of the protein at the surface of cells or during embryonic development. Full-

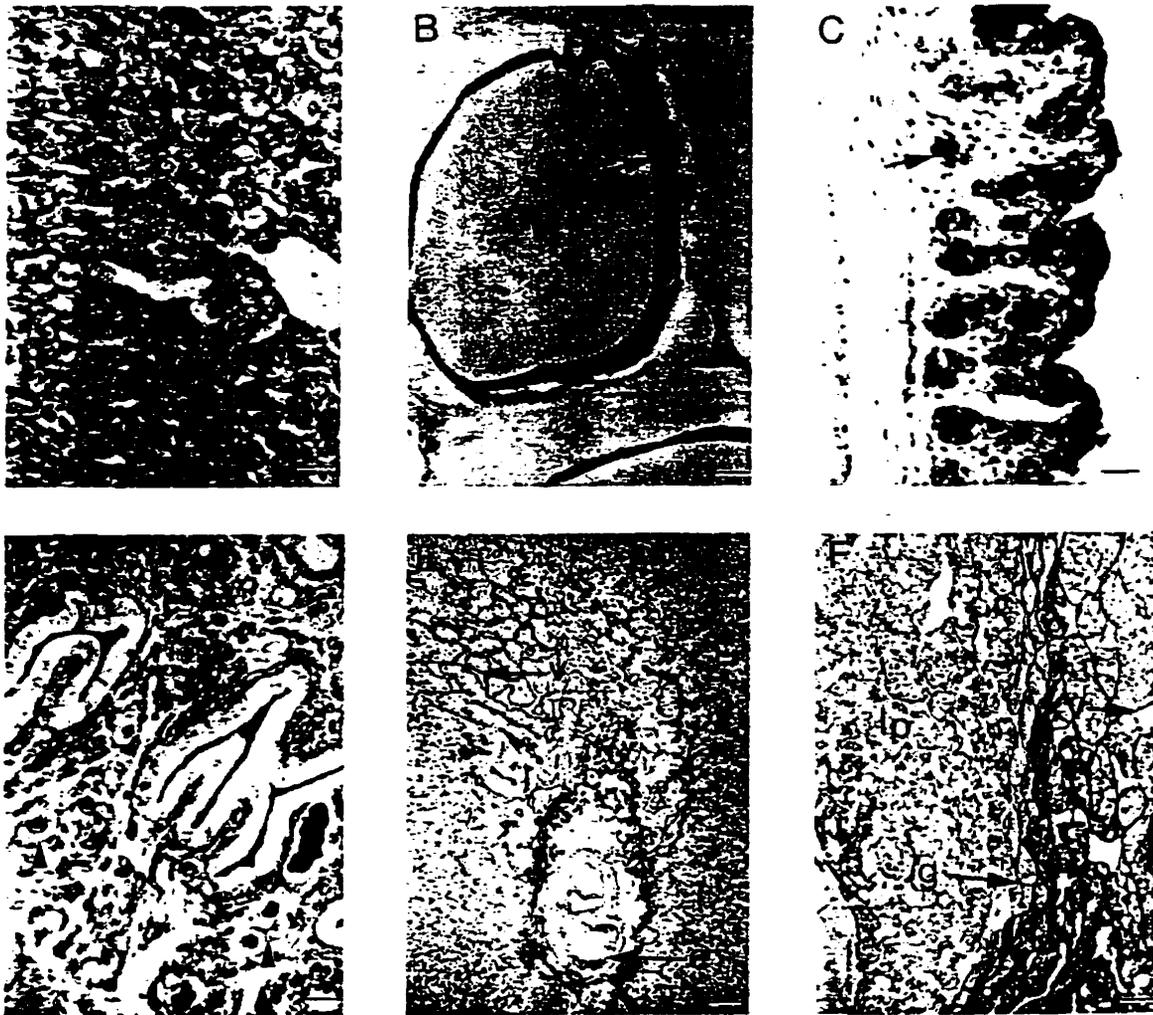


Fig. 3. Expression of Bgp1 recognized by AgB10 and 231 antibodies in various tissues. A: The AgB10 positive material is localized in the bile canaliculi of the liver. Bar = 9  $\mu$ m. B: The AgB10 positive material is localized in the brush border zone of the small intestinal epithelial cells, indicated by an arrow. In the tangential section through the villus, the core of cytoplasm of microvilli are seen as unstained white dots surrounded by membrane-localized AgB10 positive material. (CC1 stained material was also located on epithelial cell surfaces). Bar = 13  $\mu$ m. C: The 231 positive material is identified on the surface of the gut epithelium as well as mucus-containing cells (arrow). Bar = 17  $\mu$ m. D: Endometrial glands in a 7.5 dpc conceptus. The epithelial cell surfaces of the glands show a positive reaction against antibody 231 (arrowheads). Bar = 17  $\mu$ m. E:

Sagittal section through a 7.5 dpc conceptus illustrating complete absence of a staining reaction in the embryo (e) during the gastrulation phase and extra-embryonic membranes, and heavy specific staining reaction with antibody 231 in the endothelia of maternal blood vessels (v) seen in the decidua of the placenta. The large decidua cells between maternal vessels show no reaction. Bar = 125  $\mu$ m. F: Section through a 10.5 dpc placenta showing a positive labeling reaction with polyclonal antibody 231 restricted to the cell surfaces surrounding the polar giant trophoblast cells (g). The fetal and maternal endothelial cells of the labyrinthine placental region (lp) show no reaction to 231, whereas endothelia of maternal vessels (v) in the decidua region show a distinct reaction (arrow). Bar = 50  $\mu$ m.

length Bgp1 contains 16 N-linked glycosylation consensus sequences and a great number of O-linked carbohydrate recognition sites. The addition of sugars on these sites may vary during embryonic development or in different tissues. Similarly, Bgp1 may be differentially phosphorylated in various cell types (Afar et al., 1992). This could explain the distinctive immunostain-

ing results obtained with the three antibodies used. When possible, the immunostaining data has been confirmed by *in situ* hybridization with a very specific Bgp1 riboprobe or sustained by results of other investigators in different species.

The identification of distinctive patterns of immunostaining in cells derived from all three germ layers

TABLE 1. Immunolocalization of Bgp1 Epitopes Using Bgp1-Specific Antibodies\*

	CC1		231		AgB10							
	10.5d	15.5d	10.5d	15.5d	10.5d	15.5						
Extra-embryonic membranes												
Yolk sac visceral endoderm	+	+	+	+	+++	+++						
mesenchyme	-	-	-	-	-	-						
Yolk sac parietal endoderm	-	-	-	-	-	-						
mesenchyme	-	-	-	-	-	-						
Allantoic mesenchyme	-	-	-	-	-	-						
Uterine glands	+	+	+	+	+	+						
Uterine endothelium	-	-	+++	+++	-	-						
Polar giant trophoblast	+	+	+	+	-	-						
Mural giant trophoblast	+	+/-	+/-	+/-	-	-						
	CC1 (10.5d)		CC1 (15.5d)		231 (10.5d)		231 (15.5d)		AgB10 (10.5d)		AgB10 (15.5)	
	ep	mes	ep	mes	ep	mes	ep	mes	ep	mes	ep	mes
Embryonic tissues												
Skin	-	-	-	++	+	-	++	-	-	-	-	-
Nose	-	-	-	-	+	-	++	-	+/-	-	-	-
Hair rudiment	NA	NA	-	+	NA	NA	+	-	-	-	-	-
Tongue	NA	ND	-	+	ND	-	++	-	-	-	-	-
Palate	-	ND	-	++	+	-	+	-	-	-	-	-
Salivary	-	-	-	+	ND	-	ND	-	ND	-	++	-
Neuroepithelium												
Brain	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Spinal cord	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Meninges	NA	+	NA	+	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Intra-embryonic endoderm												
Pharyngeal	++	-	+/-	-	-	-	+	-	+	-	+/-	-
Esophageal	++	-	+/-	-	-	-	+	-	+	-	+/-	-
Stomach	+	-	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Duodenal	+	-	+/-	-	-	-	+	-	+	-	+/-	-
Small intestinal	+	+	+/-	-	-	-	+	+	+	-	+/-	-
Colonic	+	-	+/-	-	-	-	+	-	+	-	+/-	-
Rectal <sup>b</sup>	+	-	++	-	-	-	+++	-	+	-	++	-
Lung	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Liver	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pancreatic	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Bladder	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prostatic	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-
Mesothelium	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Intermediate mesoderm												
Metanephric	NA	NA	-	+	NA	NA	-	-	NA	NA	+++	-

\*ep, epithelium; mes, mesenchyme; NA, not applicable; ND, not determined; + + +, higher intensity reaction.

<sup>a</sup>Nasal epithelial glands strongly positive.

<sup>b</sup>Multilayered rectal epithelium.

with antibodies raised against Bgp1 suggests that 1) a variety of epitopic forms of Bgp1 are detectable, suggestive of significant developmental roles. The developmental events involved in placental adaptation and a variety of subsequent epithelial-mesenchymal interactions involve specific forms of the Bgp1 proteins. 2) Whereas monoclonal antibodies CC1 and AgB10 identify cell surface material, the polyclonal antibody (231) identifies both cytoplasmic and cell surface forms of Bgp1. 3) Bgp1 in mesenchymal tissues appears during later phases of active histogenesis and organogenesis. While all three antibodies reacted with Bgp1 proteins involved in gut development, the CC1 antibody also revealed Bgp1 proteins potentially involved in the formation of specialized mesenchymal tissues. CC1 also

recognized a myoblast cell surface Bgp1 epitope expressed during secondary myotube formation.

#### Bgp1 May Play a Role During the Critical Phase of Embryo Implantation

Examination of the early post-implantation embryo revealed that the Bgp1 proteins are not expressed during the gastrulation period, which is when the three primary germ layers are formed. The early phases in extraembryonic membrane formation also showed no detectable Bgp1 protein expression. The active expression of Bgp1 proteins in the pregnant mouse uterus agrees with previous reports of endometrial gland expression of Cell CAM-105 (renamed C-CAM1, a Bgp1 homolog) in the rat (Svalander et al., 1990). This report

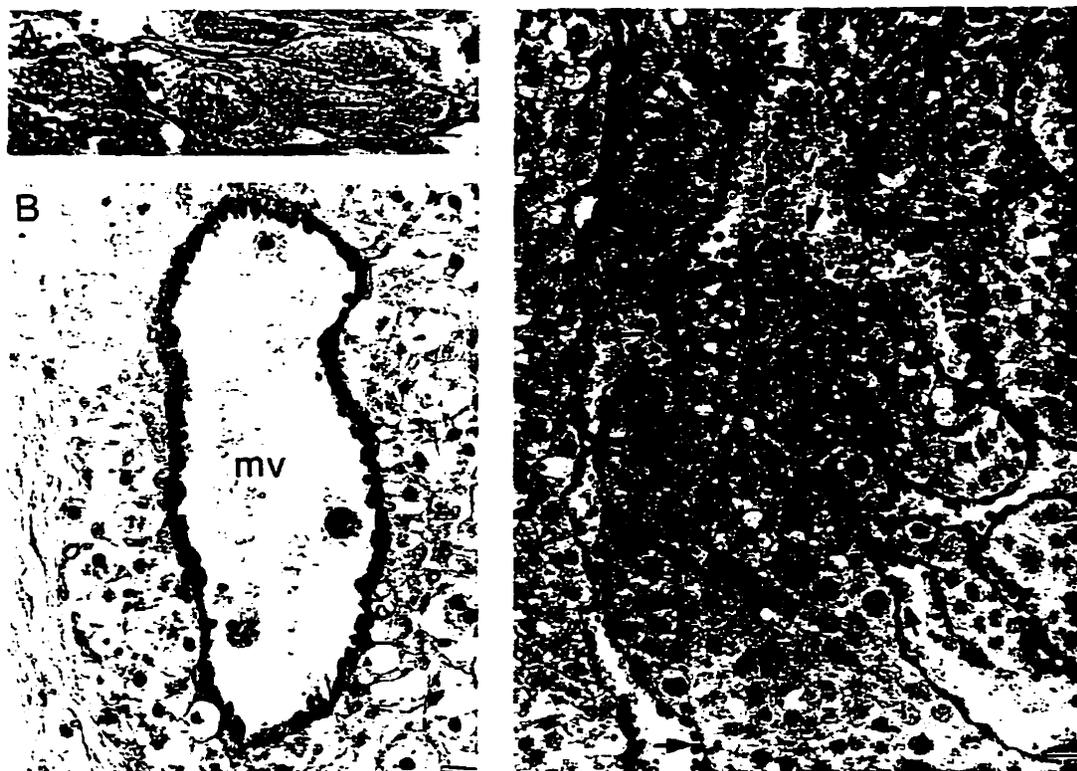


Fig. 4. Bgp1 expression in the 10.5 dpc placenta. A: The polar trophoblast giant cells show a concentration of Bgp1 mRNA (arrow points to grains of detected mRNA) in the perinuclear cytoplasm. Bar = 20  $\mu$ m. B: High magnification of a large maternal blood vessel (mv) seen in a 10.5 dpc decidua stained with the 231 antibody. Note the thickened endothelium with stained cytoplasm and cell surface expression. Red blood cells

and large phagocytic cells with diaminobenzidine-positive material are seen in the lumen. Bar = 20  $\mu$ m. C: High magnification of decidual blood vessels is seen at 10.5 dpc. Numerous small mononuclear cells (arrows) in direct contact with endothelia which are positively stained with antibody 231. Bar = 20  $\mu$ m.

clearly demonstrated that Bgp expression is increased in the glandular epithelium in response to progesterone treatment. However, expression of Bgp1 proteins occurs in the early pregnant endometrial glands (Fig. 3D) and endothelia, a period during which successful reception and tolerance of the embryo by the uterus is established. It is well known that endothelial cell adhesion molecules (such as E- and P-selectin) are inducible (Gotsch et al., 1994), and it appears that Bgp1, an adhesion molecule of the immunoglobulin family, is significantly expressed in local endothelia during decidual reaction. Several studies on human and mouse placental development (Ruck et al., 1994) suggest that the timely expression of cell adhesion molecules in the placenta may be essential for normal development and the regulation of the local maternal immune responses to the genetically foreign embryo (paternal antigens expressed on trophoblastic cells). The presence of large numbers of small mononuclear cells firmly adherent to the Bgp1-positive endothelial cells of decidual vessels suggests that this protein may be involved, together

with other adhesion molecules, in the selective recruitment of hemopoietic cells in the pregnant uterus. It is now well established that bone marrow-derived cells infiltrate the decidua (Gambel et al., 1985). Other cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family (I-CAM and V-CAM) have previously been identified in the human decidua (Ruck et al., 1994).

Our observations in the mouse conceptus clearly demonstrate that Bgp1 is preferentially expressed in the maternal endothelia localized in the decidua (the site where blood-borne cells infiltrate) but not in the maternal or fetal endothelia predominant in the labyrinthine placenta (a site for diffusional exchange) (Fig. 3F).

#### Bgp1 Is Expressed During Early Morphogenesis of the Surface Ectoderm

The identification of an intense immunoreaction for Bgp1 with antibody 231 exclusively in the primitive surface ectoderm indicates that Bgp1 may participate in the earliest events in skin development. Of particular interest was the abrupt absence of both Bgp1

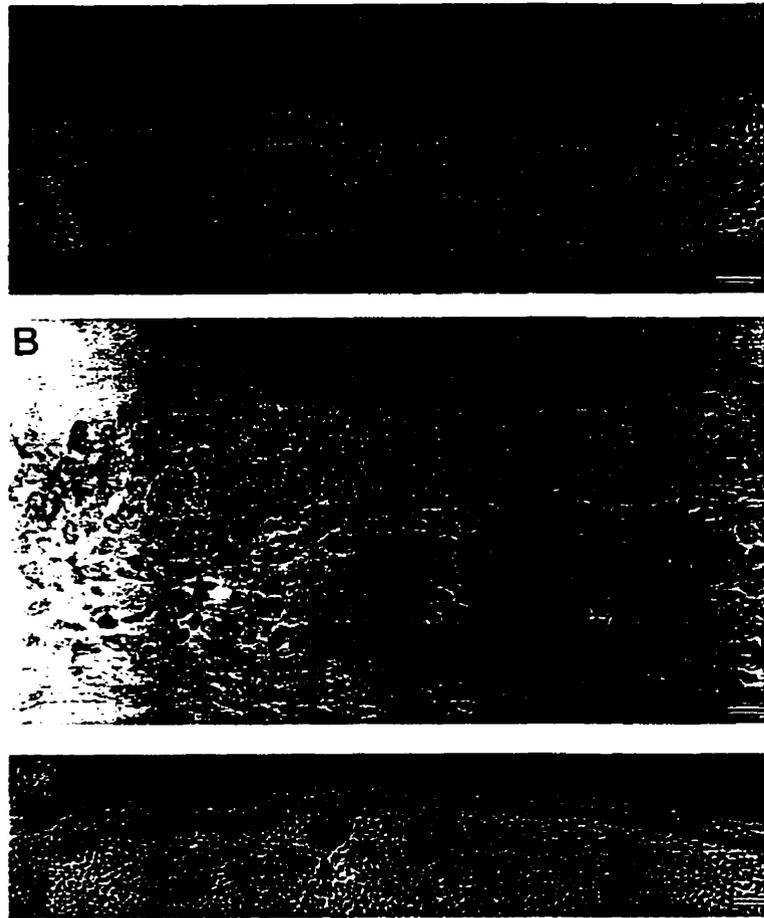


Fig. 5. A: A section through the skin of a 15.5 dpc fetus. In situ hybridization detection of *Bgp1* mRNA in the cytoplasm of the stratified surface epithelium is visible by the deep blue precipitate. The aggregate of epithelial cells that comprise the anlage of hair follicles (arrows) are devoid of *Bgp1* mRNA. Bar = 33  $\mu$ m. B: Higher magnification shows positive reaction in the epidermis but negative expression in the hair

anlage and most of the cytoplasm of the basal cells (arrow). Bar = 13  $\mu$ m. C: A similar section through the skin of a 15.5 dpc fetus showing an intense brown staining reaction with antibody 231 in the surface stratified epithelium, and absence of any staining reaction in the anlage of hair follicles (arrows). Bar = 50  $\mu$ m.

mRNA and protein in the discrete centres of hair anlage in comparison to its presence in the surface-stratified epithelium of the developing skin. During skin morphogenesis, the formation of an epithelial placode and subsequent induction of a mesenchymal condensation is followed by reciprocal mesenchymal-epithelial interactions which result in specific cutaneous structures (Sengel, 1976). Various classes of cell adhesion molecules are known to be differentially expressed during skin morphogenesis, and the immunolocalization patterns for P-cadherin and E-cadherin in mouse embryo epidermis and vibrissa follicles suggest that, apart from cell adhesive roles, the preferential localization of P-cadherin in the proliferative cell layer may suggest a role in the proliferative activity of basal cells (Hirae et al., 1989). The absence of *Bgp1* in the devel-

oping hair placode, which is characterized by significant changes in proliferative activity and adhesive properties, may implicate this protein in early events during epidermal morphogenesis. Recently, it was reported that human BGP was detected during normal morphogenesis of sebaceous glands as well as in neoplasms involving these structures (Metze et al., 1996). The involvement in morphogenesis of other ectodermal structures such as mammary gland and enamel organ remains to be determined.

#### ***Bgp1* May Be Involved in Secretion/Reabsorption Throughout Development**

The intense staining reaction with AgB10 in the apical region of the visceral yolk sac endodermal cells is



Fig. 6. Expression of Bgp1 protein in the developing gut. A: A coronal section through a 10.5 dpc embryo stained with monoclonal antibody CC1. The entire primitive gut endodermal layer (arrow) shows a positive reaction. The neural tube (n), all primitive mesenchyme (somites, s; limb bud mesenchyme, lb), endothelia of aorta (A), and surface ectoderm show no reaction. Bar = 50  $\mu$ m. B: Sagittal section through a 15.5 dpc fetus. A reaction to antibody 231 is seen in the luminal cell surfaces of the stomach (st), intestines (i), and colon (c). The gut mesenchyme, fetal liver (lv), and mesentery showed no immunoreaction. Bar = 35  $\mu$ m. C: Sagittal section through a 15.5 dpc fetus. A reaction to monoclonal antibody AgB10 is restricted to the surfaces of the multilayered rectal epithelium (r). The gut mesenchyme, bladder epithelium (b), and mesonephric duct (md) show no reaction. Bar = 385  $\mu$ m. D: High magnification of a section through the rectum seen in C showing the multilayered epithelium (arrow) with an intense positive reaction for AgB10 (also reactive for CC1 and 231). The associated gut mesenchyme shows no reaction with any of the three antibodies. Bar = 15  $\mu$ m.

that in the early phases, before a functional vascularized chorioallantoic placenta develops, the yolk sac (choriovitelline placenta) serves as the main functional site for the embryonic acquisition of nutrients (proteins) (reviewed by Jollie, 1986). Ultrastructural studies, supported by functional studies (Haar and Acker-

significant for two reasons. First, the immunoreaction appears to be consistently associated with epithelial cell surfaces characterized by the presence of microvilli, e.g., in adult bile canaliculi (Kuprina et al., 1990), and with several embryonic epithelial cells identified in our study. Second, it is now well established

that in the early phases, before a functional vascularized chorioallantoic placenta develops, the yolk sac (choriovitelline placenta) serves as the main functional site for the embryonic acquisition of nutrients (proteins) (reviewed by Jollie, 1986). Ultrastructural studies, supported by functional studies (Haar and Acker-

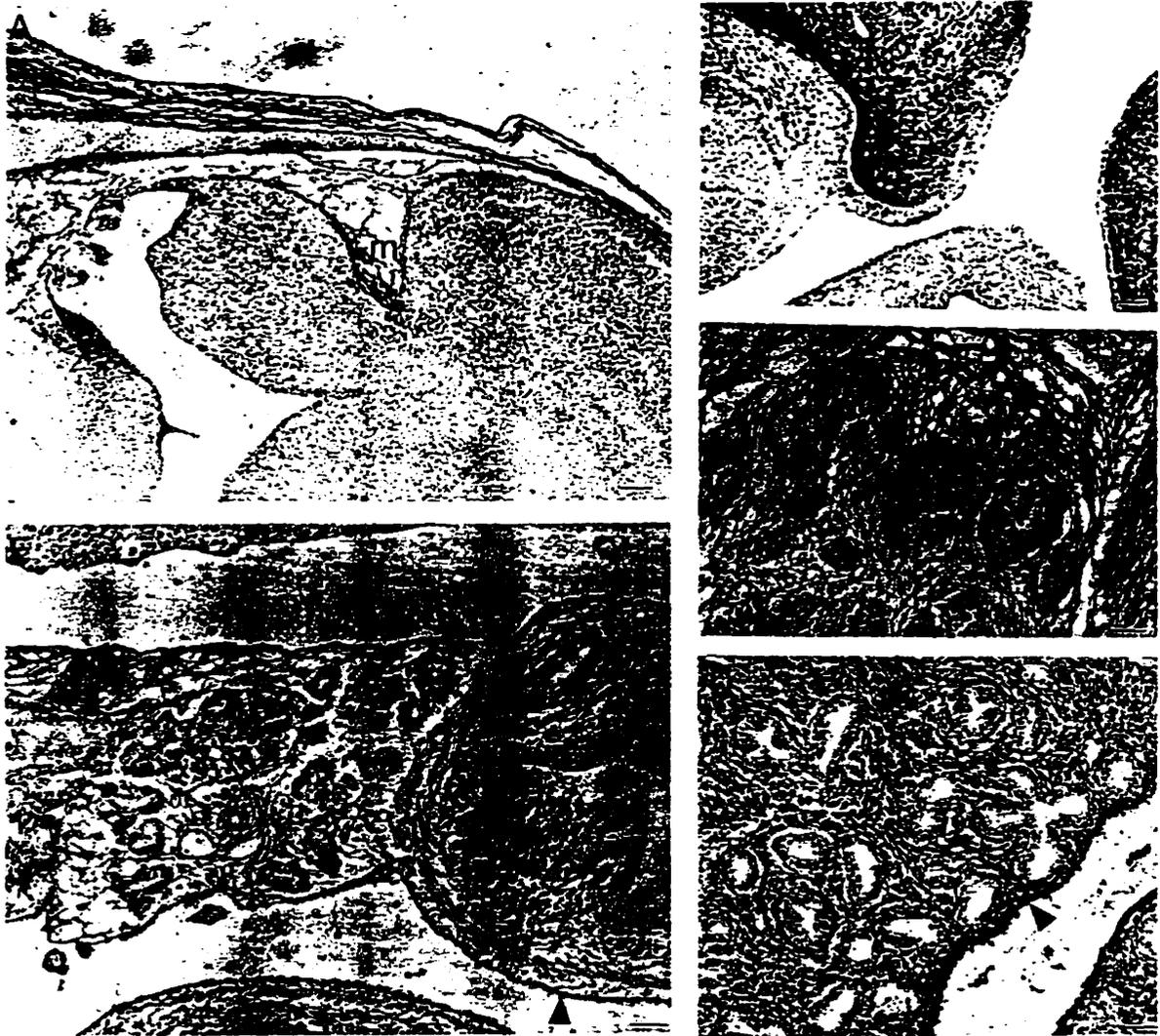


Fig. 7. CC1 immunostaining in mesenchymal tissues of a 15.5 dpc fetus. A: The meninges (m) on the surface of the brain and sulci show a strong reaction. The brain tissue is negative, whereas perichondrium and dermal mesenchyme also show a reaction. Bar = 104  $\mu$ m. B: A positive CC1 reaction in the head mesenchyme is seen in the lip (arrow). Bar =

50  $\mu$ m. C: Salivary gland mesenchyme (arrow), (D) lung mesenchyme (arrow), and (E) pancreatic mesenchyme (arrow) were positive with this antibody. The duodenal mesenchyme (E) is negative. A positive reaction was also identified in the mesothelial lining of the lung and intestine (black arrowheads in D and E). Bar = 33  $\mu$ m.

man, 1971), revealed that the endodermal apical surface contains profuse microvilli, coated invaginations, and absorptive vacuoles. The temporal and structural localization characteristics suggest that AgB10 identifies Bgp1 proteins involved in absorptive activities. This possibility is supported by the immunolocalization of AgB10-reactive Bgp1 proteins in the primitive gut endodermal surfaces at 10.5 dpc (normally active in reabsorption of amniotic fluid), metanephric

kidney tubules at 15.5 dpc (normally active in reabsorptive activities during a period of urine formation in the fetus), as well as in nasal mucus glands and salivary glands and ducts (active in secretion and reabsorption). In this regard, our interpretation would suggest that the AgB10-specific isoform of the Bgp1 protein represents a molecule, presented at the epithelial absorption surface, that has similar absorption functions in prenatal and postnatal development.



Fig. 8. AgB10 immunostaining in various tissues. A: A thick section of an isolated yolk sac showing a uniform intense AgB10 positive staining reaction restricted to the apical surface of the visceral yolk sac endoderm (ys). Bar = 385  $\mu$ m. B: High magnification of an intact visceral yolk sac showing the direct relationship of the absorptive surface of the visceral endoderm (ve, shown with AgB10 positive reaction on its apical surface) to the maternal blood (the curved arrow indicates direction of maternal nutrient transfer to the embryo vessels in the yolk sac). The parietal endoderm (pe), mural giant trophoblast (g), and maternal blood vessels

(mv) show no reaction. Bar = 13  $\mu$ m. C: Sagittal section through the metanephric kidney of a 15.5 dpc fetus. A reaction to the monoclonal antibody AgB10 is restricted to the luminal surfaces of the kidney tubules (arrows). The glomerulus and mesenchyme show no reaction. Bar = 33  $\mu$ m. D: Sagittal section through the salivary gland in an 18.5 dpc fetus. The luminal surfaces of the glandular epithelium as well as the ductular epithelium (see arrow in tongue region) show intense positive reactions. The associated mesenchyme showed no reaction. Bar = 385  $\mu$ m.

#### Bgp1 Is Expressed in Early Gut Development as Well as Mesodermal Differentiative Activities

The developing gut epithelium revealed temporal and regional differences in the immunoreaction with the three antibodies. Monoclonal antibodies CC1 and AgB10 reacted with the entire primitive endoderm as early as 10.5 dpc but eventually predominated in the distal colon (rectal regions). In contrast, antigens reactive to antibody 231 appeared later and persisted throughout the late fetal gut epithelium. The gut-associated mesenchyme demonstrated no reaction to any of the antibodies, suggesting that the epitopes recognized by the anti-Bgp1 antibodies were confined to the differentiating gut epithelium in surface locations and were possibly related to its functions.

Two features of Bgp1 expression in the developing gut are noteworthy. 1) The localization characteristics of Bgp1 in the developing gut parallel that of carcino-embryonic antigen in the human fetus (Nap et al.,

1988; Benchimol et al., 1989); the primitive multicellular gut epithelium normally displays CEA expression, and loss of CEA expression is seen in craniocaudal differentiation and ultimate assumption of a normal simple epithelium. However, Bgp1 expression occurs much earlier (clearly detectable at 10.5 days) than in the human gut (seen at 9 weeks, equivalent to mouse gestational age 14.5 dpc) (von Kleist et al., 1986; Nap et al., 1988). Interestingly, the expression of the human CEA transgene in the mouse was first detected at 14.5 dpc (Eades-Perner et al., 1994). Bgp1 is expressed earlier (10.5 dpc) than the CEA transgene (14.5 dpc) and therefore may fulfill earlier essential roles during gut morphogenesis. Interestingly, the HNF-4 *trans*-acting factor, shown to be critically involved in *Drosophila* gut morphogenesis (Zhong et al., 1993), is also actively implicated in transcription of the human BGP gene (Hauck et al., 1994) but has no effect on transcription of the CEA gene (Hauck and Stanners, 1995). 2) The

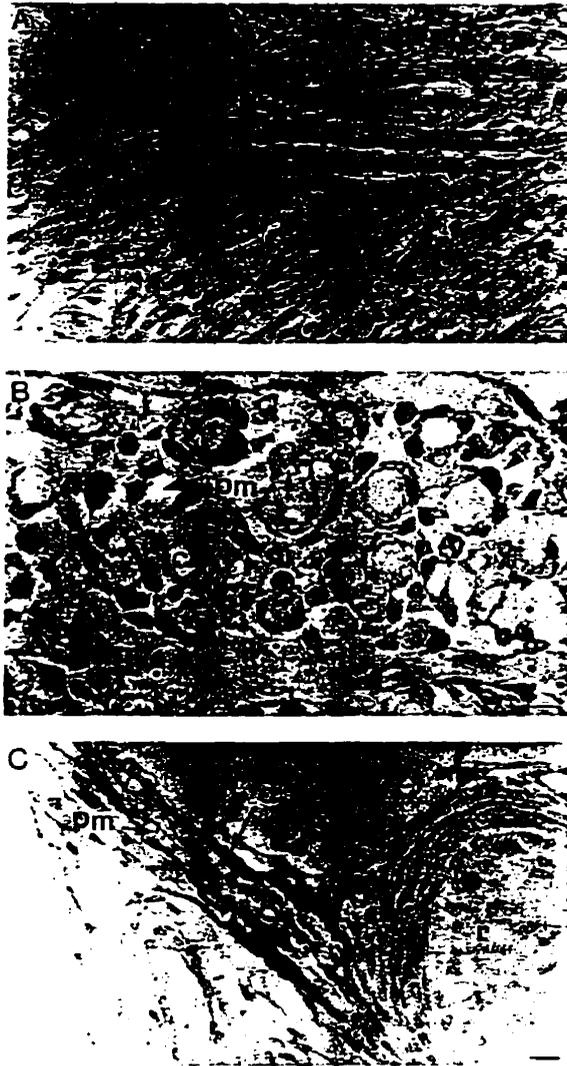


Fig. 9. A: Sagittal section through the developing intercostal muscles in a 15.5 dpc fetus showing positive CC1 staining reaction in 1) single spindle-shaped mesenchymal cells (single arrowhead) intimately associated with negatively stained primary embryonic myotubes (pm) and 2) an alignment of mesenchymal cells (developing secondary myotubes, double arrowhead) intimately associated on either side of primary myotubes (pm). r, rib cartilage. Bar = 13  $\mu$ m. B: Cross section through the diaphragm of a 15.5 dpc fetus. The intimate association of CC1-positive mesenchymal cells (arrowheads) on the surface of the larger primary myotubes (pm) is clearly seen in the cross section. The extensive cytoplasm of the primary myotube show no reaction. The asterisks in primary myotubes indicate sections through the nuclei. A capillary (c) with red blood cells and mesenchymal cells (m) (no immunoreactions) are distinguishable. Bar = 5  $\mu$ m. C: A sagittal section through the intercostal muscles of a 15.5 dpc fetus which has been stained with the monoclonal antibody against desmin. Small spindle-shaped mesenchymal cells (d) intimately attached to primary myotubes (pm) show an intense positive staining reaction for the intermediate filament protein desmin. The extensive cytoplasm of the primary myotubes show a diffuse positive reaction to the monoclonal antibody against desmin. Bar = 11  $\mu$ m.

Bgp1 epitopes identified with mAb CC1 and AgB10 are more characteristic of the primitive gut epithelium, whereas epitopes identified by polyclonal antibody 231 appeared later and persisted in normal epithelium.

#### Bgp1 Is Expressed During Secondary Myotube Formation In Vivo

The identification of Bgp1 on myoblasts was restricted to a distinct phase in the complex process of myogenesis. CC1 immunoreactivity was not observed in desmin-positive cells identified in the myotome or in migratory desmin-positive cells. At terminal sites of active myogenesis, preformed primary myotubes displayed no Bgp1 protein, whereas secondary myoblasts seen as singlets or as myotubes of various sizes on the circumference of primary myotubes stained intensely. The precise location, morphology, and temporal features of protein expression and fusion characteristics (Harris et al., 1989; Zhang and McLennan, 1995) clearly suggest that Bgp1 is present on secondary myoblasts during an active phase of axial myogenesis in the fetus. The initial identification of this phase at 13.5 dpc and a preponderance in subsequent days (14.5–17.5 dpc) may account for the sudden peak (16.5 dpc) in Bgp1 expression observed during embryogenesis.

The characteristics of Bgp1 expression suggest an involvement in cell recognition between secondary myoblasts and/or secondary myoblasts and primary myotubes. Whether Bgp1 is expressed during actual fusion of cell membranes is unknown. Other adhesion molecules (N-CAM, N-cadherin) are active in this complex process (Knudsen et al., 1990). Light microscopical studies in vivo have indicated that an integrin ( $\alpha_4\beta_1$  or VLA-4) and its counter receptor, vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) are expressed at sites of secondary myogenesis (Rosen et al., 1992). The microscopic description of VCAM-1 positive mononuclear cells adhering to primary myotubes is similar to our identification of Bgp-1 positive mononuclear cells on primary myotubes. There is a significant accumulation of data suggesting that the two temporal forms of myogenesis (embryonic and fetal phases of myogenesis) indicate myoblast diversity (Miller, 1992) and the possibility that this process involves distinguishable regulatory factors. It is of renewed interest that at least two immunoglobulin family members (VCAM-1 and Bgp1) are expressed during secondary myogenesis. Recent studies (Venuti et al., 1995) suggest that the myogenin-mutant mouse embryos appear to have striking defects during the phase of secondary myofiber formation, and RT-PCR studies indicate that VCAM-1 expression was not affected by the absence of myogenin. The effect of myogenin deficiency on the expression of Bgp1 during secondary myogenesis is unknown.

Our observations on the changes in Bgp1 expression in decidual endothelia, hair anlage, differentiation of the gut multicellular epithelium, and formation of secondary myotubes are all in accordance with the hypothesis that Bgp1 isoforms act as cell adhesion mole-

cules in these circumstances (Turbide et al., 1991; McCuaig et al., 1992). But these observations also introduce the possibilities of involvement in cell recruitment (in the placenta), influence on cell proliferation (in the epidermis and gut), and mesenchymal-epithelial cellular interactions during organ formation (salivary gland, kidney, lung, pancreas, skin). The identification of spatial and temporal Bgp1 localization provides a basis for our current analysis of the Bgp1 functions in Bgp1-/- mutant embryos.

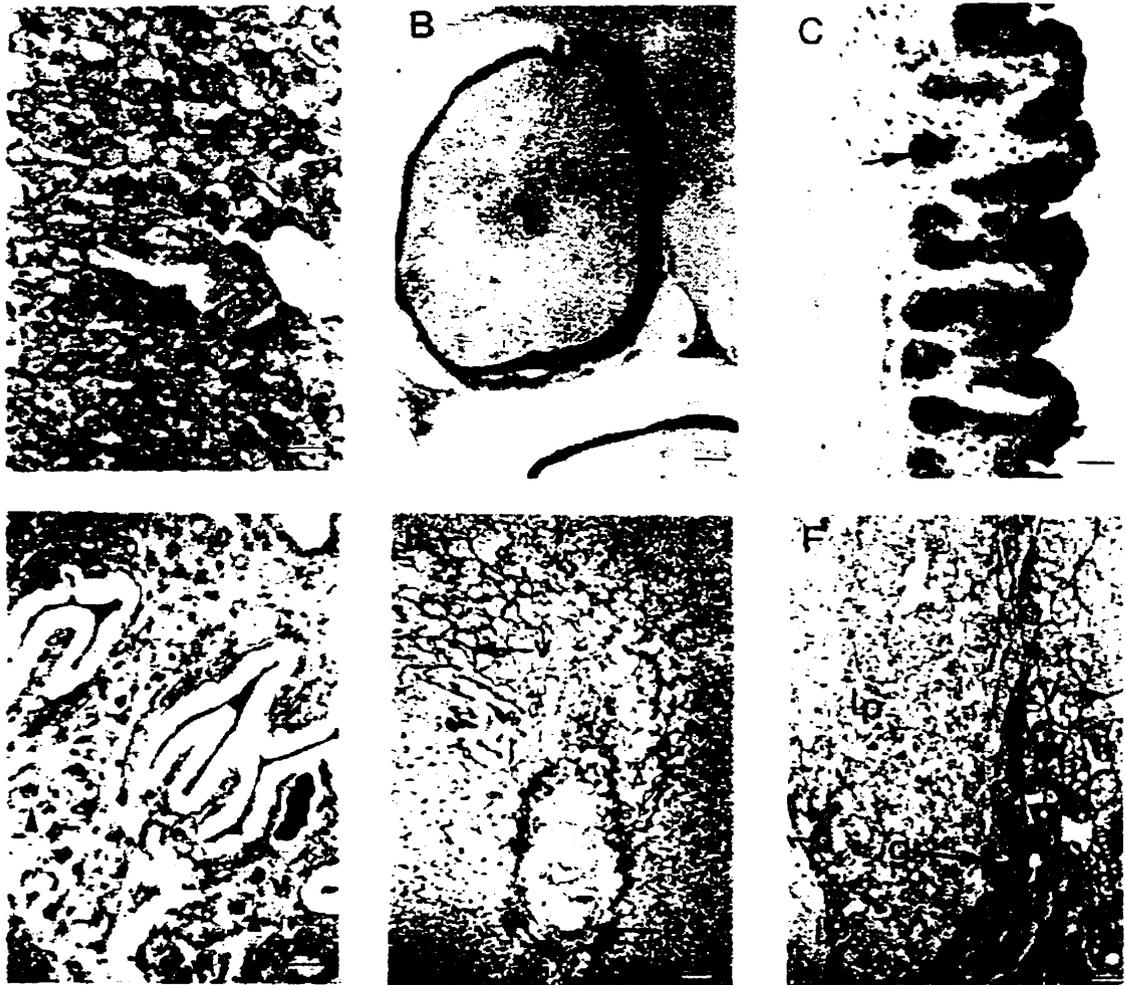
#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Drs. Serge Jothy and Michel Tremblay for insightful discussions and critical reading of the manuscript. We are also greatly indebted to Dr. Abelev (Moscow, Russia) for suggesting the use of the AgB10 antibody to the Montreal group. Stéphanie Létourneau is supported by a studentship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche and Nicole Beauchemin is a scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (N.B.: MT-12236), from the NIH (K.V.H.: NIH AI25231) and from the U.S. University of the Health Sciences (G.D.: USUHS CO74ET).

#### REFERENCES

- Afar, D.E.H., Stanners, C.P., and Bell, J.C. (1992) Tyrosine phosphorylation of biliary glycoprotein, a cell adhesion molecule related to carcinoembryonic antigen. *Biochim. Biophys. Acta* 1134:46-52.
- Aurivillius, M., Hansen, O.C., Lazrek, M.B.S., Bock, E., and Öbrink, B. (1990) The cell adhesion molecule Cell-CAM 105 is an ecto-ATPase and a member of the immunoglobulin superfamily. *FEBS Lett.* 264:267-269.
- Barnett, T.R., Kretschmer, A., Austen, D.A., Goebel, S.J., Hart, J.T., Elting, J.J., and Kamarck, M.E. (1989) Carcinoembryonic antigens: alternative splicing accounts for the multiple mRNAs that code for novel members of the carcinoembryonic antigen family. *J. Cell Biol.* 108:267-276.
- Barnett, T.R., Drake, L., and Pickle II, W. (1993) Human biliary glycoprotein gene: Characterization of a family of novel alternatively spliced RNAs and their expressed proteins. *Mol. Cell. Biol.* 13:1273-1282.
- Beauchemin, N., Benchimol, S., Cournoyer, D., Fuks, A., and Stanners, C.P. (1987) Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol. Cell. Biol.* 7:3221-3230.
- Beauchemin, N., Turbide, C., Afar, D., Bell, J., Raymond, M., Stanners, C.P., and Fuks, A. (1989) A mouse analogue of the human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 49:2017-2021.
- Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shiota, K., and Stanners, C.P. (1989) Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57:327-334.
- Blikstad, I., Wikstrom, T., Aurivillius, M., and Öbrink, B. (1992) C-CAM (Cell-CAM 105) is a calmodulin binding protein. *FEBS Lett.* 302:26-30.
- Cheung, P.H., Luo, W., Qiu, Y., Zhang, X., Earley, K., Milliron, P., and Lin, S.H. (1993) Structure and function of C-CAM1. The first immunoglobulin domain is required for intercellular adhesion. *J. Biol. Chem.* 268:24303-24310.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299.
- Coutelier, J.-P., Godfraind, C., Wyszocka, M., Cardellicchio, C.B., Noel, H., and Holmes, K.V. (1994) B lymphocyte and macrophage expression of carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules that serve as receptors for murine coronavirus. *Eur. J. Immunol.* 24:1383-1390.
- Drzeniek, Z., Lamerz, R., Fenger, U., Wagener, C., and Haubeck, H.D. (1991) Identification of membrane antigens in granulocytes and colonic carcinoma cells by a monoclonal antibody specific for biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family. *Cancer Lett.* 56:173-179.
- Dvskaler, G.S., Pensiero, M.N., Cardellicchio, C.B., Williams, R.K., Jiang, G.-S., Holmes, K.V., and Dieffenbach, C.W. (1991) Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: Expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J. Virol.* 65:6881-6891.
- Dvskaler, G.S., Basile, A.A., and Dieffenbach, C.W. (1992) Analysis of gene expression: Use of oligonucleotide primers for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: "PCR Methods and Applications." Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 283-285.
- Dvskaler, G.S., Pensiero, M.N., Dieffenbach, C.W., Cardellicchio, C.B., Basile, A.A., Elia, P.E., and Holmes, K.V. (1993) Mouse hepatitis virus strain A59 and blocking antireceptor monoclonal antibody bind to the N-terminal domain of cellular receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1716-1720.
- Dvskaler, G.S., Basile, A.A., Cardellicchio, C.B., and Holmes, K.V. (1995) Mouse hepatitis virus receptor activities of an MHVR/tnp chimera and MHVR mutants lacking N-linked glycosylation of the N-terminal domain. *J. Virol.* 69:543-546.
- Eades-Perner, A.M., van der Putten, H., Hirth, A., Thompson, J., Neumaier, M., von Kleist, S., and Zimmermann, W. (1994) Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. *Cancer Res.* 54:4169-4176.
- Edlund, M., and Öbrink, B. (1993) Evidence for calmodulin binding to the cytoplasmic domains of two C-CAM isoforms. *FEBS Lett.* 327:90-94.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
- Gambel, P., Rossant, J., and Hunziker, R.D. (1985) Origin of decidual cells in murine pregnancy and pseudopregnancy. *Transplantation* 39:443-445.
- Gold, P., and Freedman, S.O. (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122:467-481.
- Gotsch, U., Jagger, U., Dominis, M., and Vestweber, D. (1994) Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF- $\alpha$  in vivo. *Cell Adhesion Comm.* 2:7-14.
- Haar, J.L., and Ackerman, G.A. (1971) Ultrastructural changes in mouse yolk sac associated with the initiation of vitelline circulation. *Anat. Rec.* 170:437-456.
- Harris, A.J., Duxson, M.J., Fitzsimons, R.B., and Rieger, F. (1989) Myonuclear birthdates distinguish the origins of primary and secondary myotubes on embryonic mammalian skeletal muscles. *Development* 107:771-784.
- Hauck, W., and Stanners, C.P. (1995) Transcriptional regulation of the carcinoembryonic antigen gene. *J. Biol. Chem.* 270:3602-3610.
- Hauck, W., Nédellec, P., Stanners, C.P., Barnett, T.R., and Beauchemin, N. (1994) Transcriptional control of the human biliary glycoprotein gene, a CEA gene family member down-regulated in colorectal carcinomas. *Eur. J. Biochem.* 223:529-541.
- Hirae, Y., Nose, A., Kobayashi, S., and Takeichi, M. (1989) Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. II. Skin morphogenesis. *Development* 105:271-277.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59.
- Huang, J.Q., Turbide, C., Daniels, E., Jothy, S., and Beauchemin, N. (1990) Spatiotemporal expression of murine carcinoembryonic antigen (CEA) gene family members during mouse embryogenesis. *Development* 110:573-588.
- Jollie, W.P. (1986) Ultrastructural studies of protein transfer across rodent yolk sac. *Placenta* 7:263-281.

- Keck, U., Nédellec, P., Beauchemin, N., Thompson, J., and Zimmermann, W. (1995) The *cea10* gene encodes a secreted member of the murine carcinoembryonic antigen family and is expressed in the placenta, gastrointestinal tract and bone marrow. *Eur. J. Biochem.* 229:455-464.
- Knudsen, K.A., Myers, L., and McElwee, S.A. (1990) A role for the  $Ca^{+2}$ -dependent adhesion molecule, N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis. *Exp. Cell Res.* 188:175-184.
- Kuprina, N.I., Baranov, V.N., Yazova, A.K., Rudinskaya, T.D., Escribano, M., Cordier, J., Gliberman, A.S., and Goussev, A.I. (1990) The antigen of bile canaliculi of the mouse hepatocyte: Identification and ultrastructural localization. *Histochemistry* 94:179-186.
- Lin, S.H., and Guidotti, G. (1989) Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma membrane ecto-ATPase. The primary structure of the ecto-ATPase is similar to that of the human biliary glycoprotein I. *J. Biol. Chem.* 264:14408-14414.
- Margolis, R.N., Taylor, S.I., Seminara, D., and Hubbard, A.L. (1988) Identification of pp120, an endogenous substrate for the hepatocyte insulin receptor tyrosine kinase, as an integral membrane glycoprotein of the bile canalicular domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7256-7259.
- McCuaig, K., Turbide, C., and Beauchemin, N. (1992) mmCGM1a: a mouse carcinoembryonic antigen gene family member, generated by alternative splicing, functions as an adhesion molecule. *Cell Growth Differ.* 3:165-174.
- McCuaig, K., Rosenberg, M., Nédellec, P., Turbide, C., and Beauchemin, N. (1993) Expression of the *bgp* gene and characterization of mouse colon biliary glycoprotein isoforms. *Gene* 127:173-183.
- Metze, D., Bhardwaj, R., Amann, U., Eades-Perner, A.M., Neumaier, M., Wagener, C., Jantschke, P., Grunert, F., and Luger, T.A. (1996) Glycoproteins of the human carcinoembryonic antigen gene family are expressed in sweat and sebaceous glands of human fetal and adult skin. *J. Invest. Dermatol.* 106:64-69.
- Miller, J.B. (1992) Myoblast diversity in skeletal myogenesis: How much and to what end? *Cell* 69:1-3.
- Najjar, S.M., Philippe, N., Suzuki, Y., Ignacio, G.A., Formisano, P., Accili, D., and Taylor, S.I. (1995) Insulin-stimulated phosphorylation of recombinant pp120/HA4, an endogenous substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochemistry* 34:9341-9349.
- Nap, M., Møllgaard, K., Burtin, P., and Fleuren, G.J. (1988) Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumor Biol.* 9:145-153.
- Nédellec, P., Dvekal, G.S., Daniels, E., Turbide, C., Chow, B., Basile, A.A., Holmes, K.V., and Beauchemin, N. (1994) *Bgp2*, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J. Virol.* 68:4525-4537.
- Nédellec, P., Turbide, C., and Beauchemin, N. (1995) Characterization and transcriptional activity of the mouse biliary glycoprotein I gene, a carcinoembryonic antigen-related gene. *Eur. J. Biochem.* 231:104-114.
- Obrink, B. (1991) C-CAM (cell-CAM 105), a member of the growing immunoglobulin superfamily of cell adhesion proteins. *Bioessays* 13:227-234.
- Ocklind, C., and Obrink, B. (1982) Intercellular adhesion of rat hepatocytes: Identification of a cell surface glycoprotein involved in the initial adhesion process. *J. Biol. Chem.* 257:6788-6795.
- Oikawa, S., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Kosaki, G., and Nakazato, H. (1992) Homotypic and heterotypic  $Ca^{+2}$ -independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:881-887.
- Olsen, A., Teglund, S., Nelson, D., Gordon, L., Copeland, A., Georgescu, A., Caranno, A., and Hammarström, S. (1994) Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: Assembly and analysis of a 700 kb cosmid contig spanning the region. *Genomics* 23:659-668.
- Rojas, M., Fuks, A., and Stanners, C.P. (1990) Biliary glycoprotein a member of the immunoglobulin supergene family, functions in vitro as a  $Ca^{+2}$ -dependent intercellular adhesion molecule. *Cell Growth Differ.* 1:527-533.
- Rosen, G.D., Sanes, J.R., LaChance, R., Cunningham, J.M., Roman, J., and Dean, D.C. (1992) Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* 69:1107-1119.
- Rosenberg, M., Nédellec, P., Jochy, S., Fleisszer, D., Turbide, C., and Beauchemin, N. (1993) The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is down-regulated in malignant mouse tissues. *Cancer Res.* 53:4938-4945.
- Ruck, P., Marzusch, K., Kaiserling, E., Horny, H.P., Deitl, J., Geiselhart, A., Handgretinger, R., and Redman, C.W. (1994) Distribution of cell adhesion molecules in decidua of early human pregnancy. An immunohistochemical study. *Lab. Invest.* 71:94-101.
- Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N.J., Sneed, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., and Jaenisch, R. (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75:1351-1359.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sengel, P. (1976) Tissue regeneration in skin morphogenesis. In: "Organ Culture in Biomedical Research." Balls, M. and Monnickendam, M. (eds). Cambridge, England: Cambridge University Press, p 111-147.
- Shipova, L.Y., Kuprina, N.Y., and Rudinskaya, T.D. (1988) A study of development of the mouse liver using membrane antigens of hepatocytes. Comparison with  $\alpha$ -fetoprotein synthesis. *Ontogenesis* 19:264-269.
- Sippel, C.J., Suchy, F.J., Ananthanarayanan, M., and Perimutter, D.H. (1993) The rat liver ecto-ATPase is also a canalicular bile acid transport protein. *J. Biol. Chem.* 268:2083-2091.
- Smith, A.L., Cardellicchio, C.B., Winograd, D.F., de Souza, M.S., Barthold, S.W., and Holmes, K.V. (1991) Monoclonal antibody to the receptor for murine coronavirus MHV-A59 inhibits viral replication in vivo. *J. Infect. Dis.* 163:879-882.
- Svalander, P.C., Odin, P., Nilsson, B.O., and Obrink, B. (1990) Expression of cellCAM-105 in the apical surface of rat uterine epithelium is controlled by ovarian steroid hormones. *J. Reprod. Fertil.* 88:213-221.
- Svenberg, T. (1976) Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile: Isolation and partial characterization. *Int. J. Cancer* 17:588-596.
- Theiler, K. (1972) "The House Mouse." New York: Springer-Verlag.
- Thompson, J.A., Grunert, F., and Zimmermann, W. (1991) Carcinoembryonic antigen gene family: Molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* 5:344-366.
- Turbide, C., Rojas, M.S., Stanners, C.P., and Beauchemin, N. (1991) A mouse carcinoembryonic antigen gene family member is a calcium-dependent cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 266:309-315.
- Venuti, J.M., Morris, J.H., Vivian, J.L., Olson, E.N., and Klein, W.H. (1995) Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J. Cell Biol.* 128:563-576.
- von Kleist, S., Winkler, J., Migule, I., and Böhm, N. (1986) Carcinoembryonic antigen (CEA) expression in early embryogenesis: A study of the first trimester of gestation. *Anticancer Res.* 6:1265-1272.
- Williams, R.K., Jiang, G.S., Snyder, S.W., Frana, M.F., and Holmes, K.V. (1990) Purification of the 110 kilodalton glycoprotein receptor for mouse hepatitis virus (MHV)-A59 from mouse liver and identification of a nonfunctional, homologous protein in MHV-resistant SJL/J mice. *J. Virol.* 64:3817-3823.
- Zhang, M., and McLennan, I. (1995) During secondary myotube formation, primary myotubes preferentially absorb new nuclei at their ends. *Dev. Dyn.* 204:168-177.
- Zhong, W., Sladek, F.M., and Darnell, J.E., Jr. (1993) The expression pattern of a *Drosophila* homolog to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation. *EMBO J.* 12:537-544.



**Figure 3**

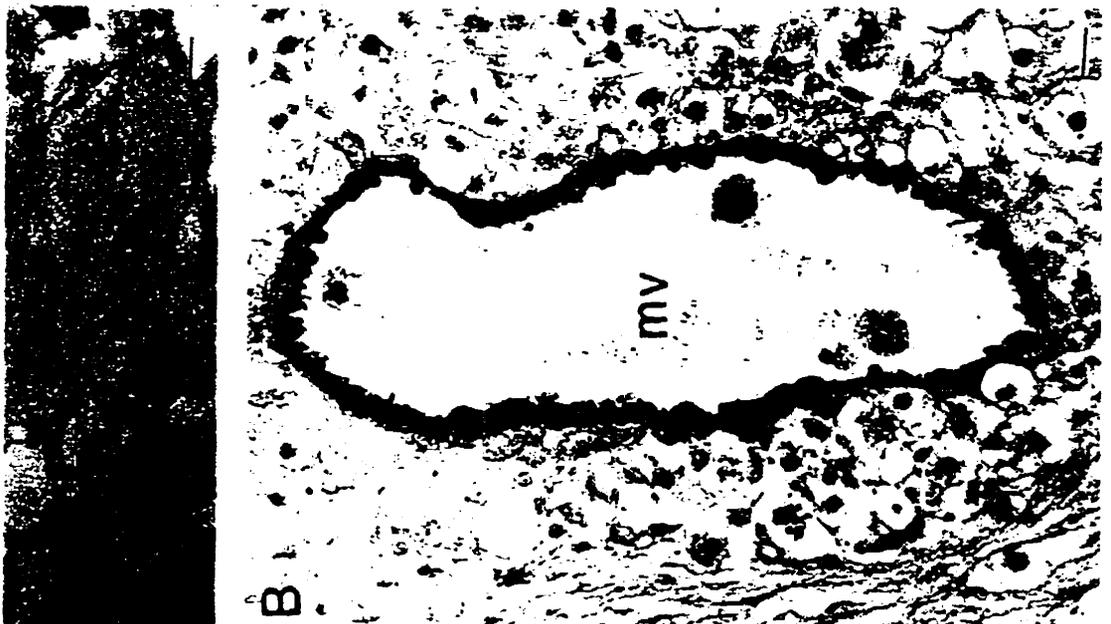
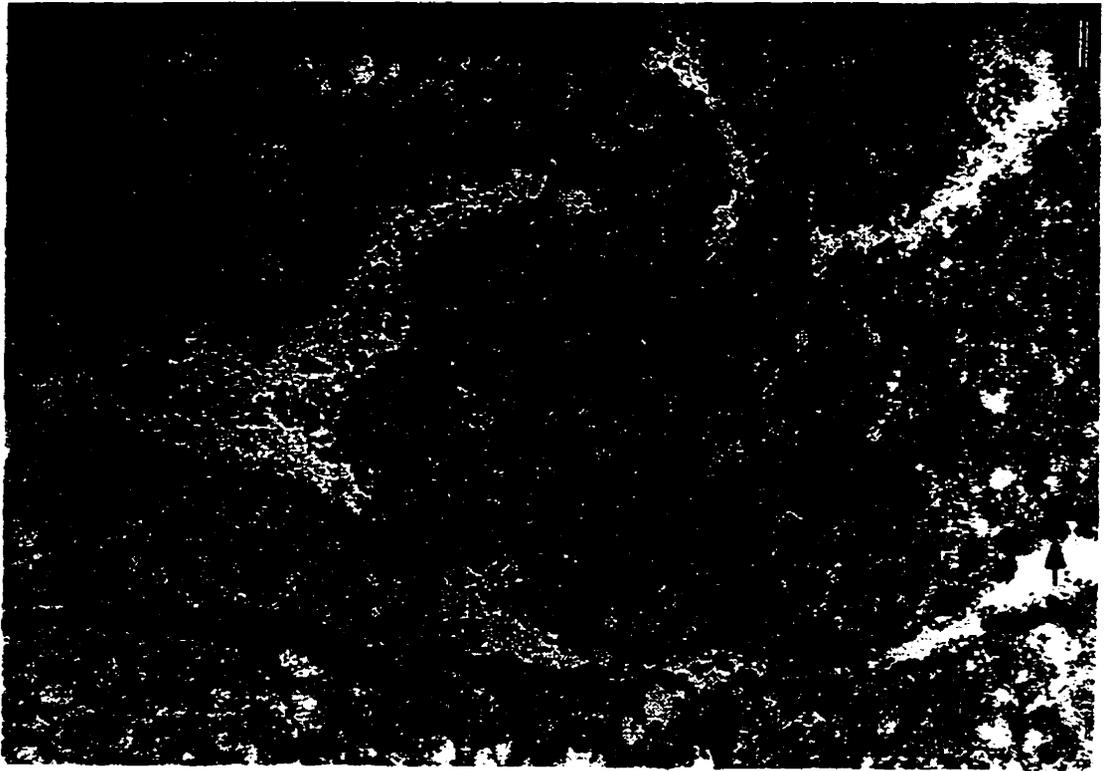
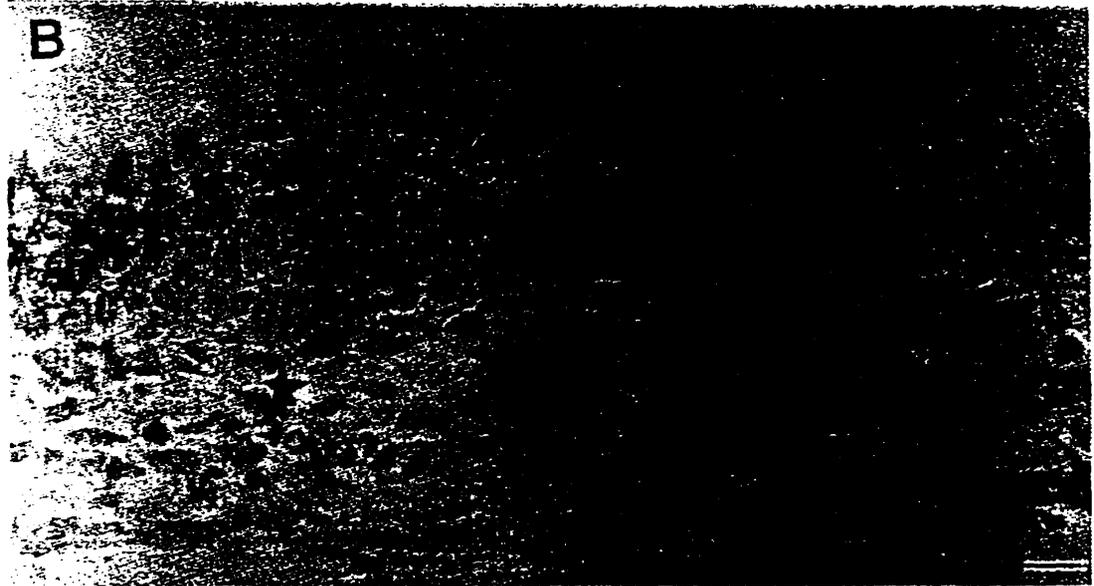
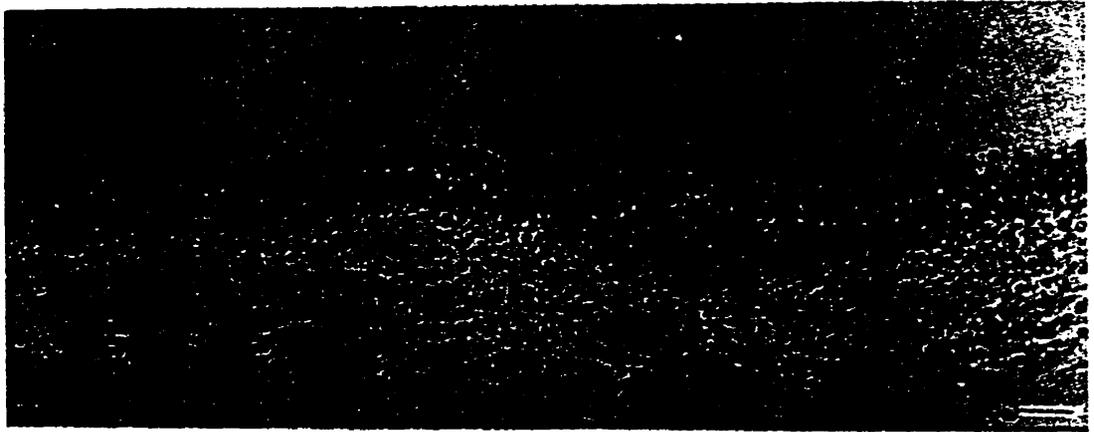
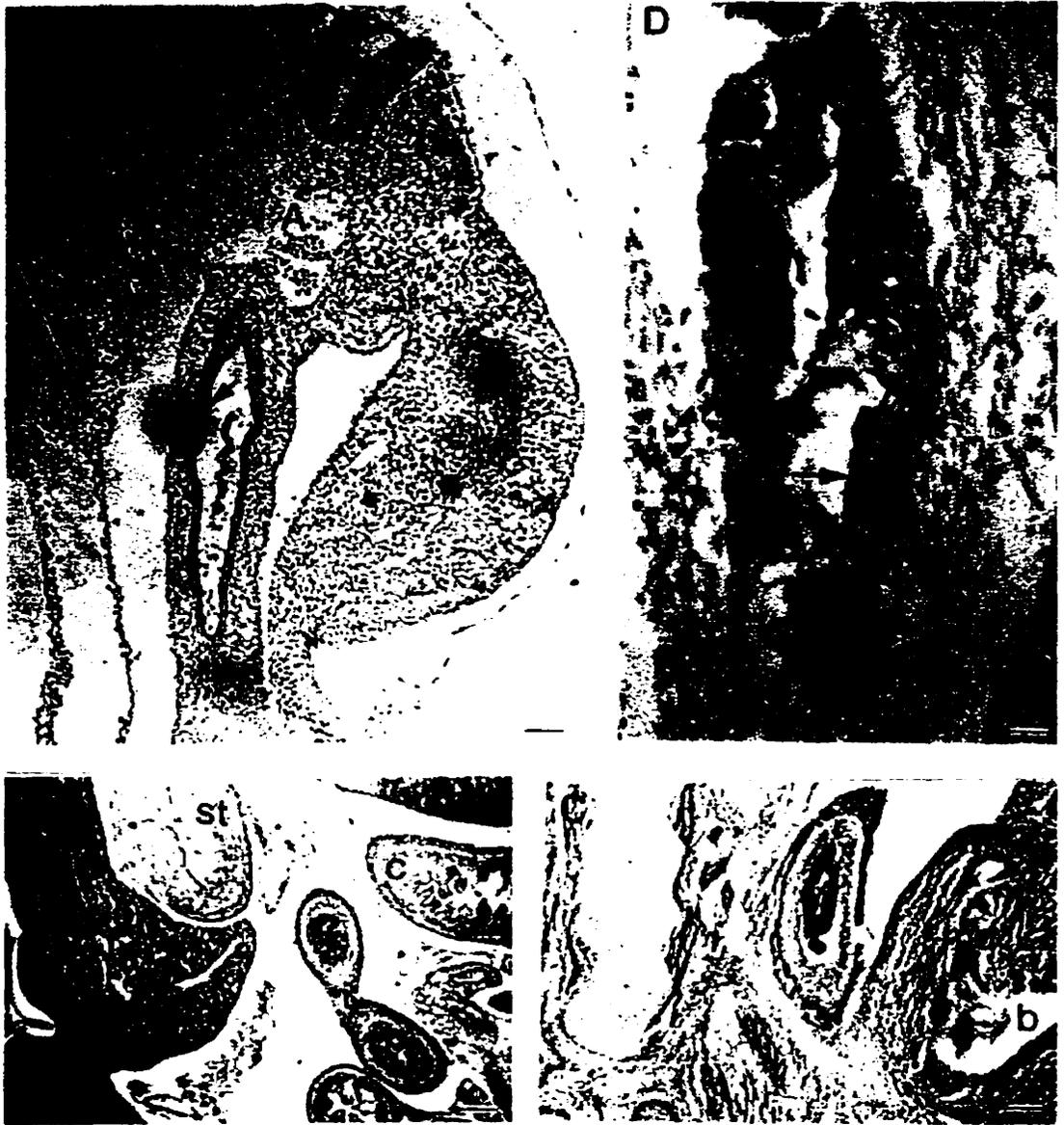


Figure 4



**Figure 5**



**Figure 6**

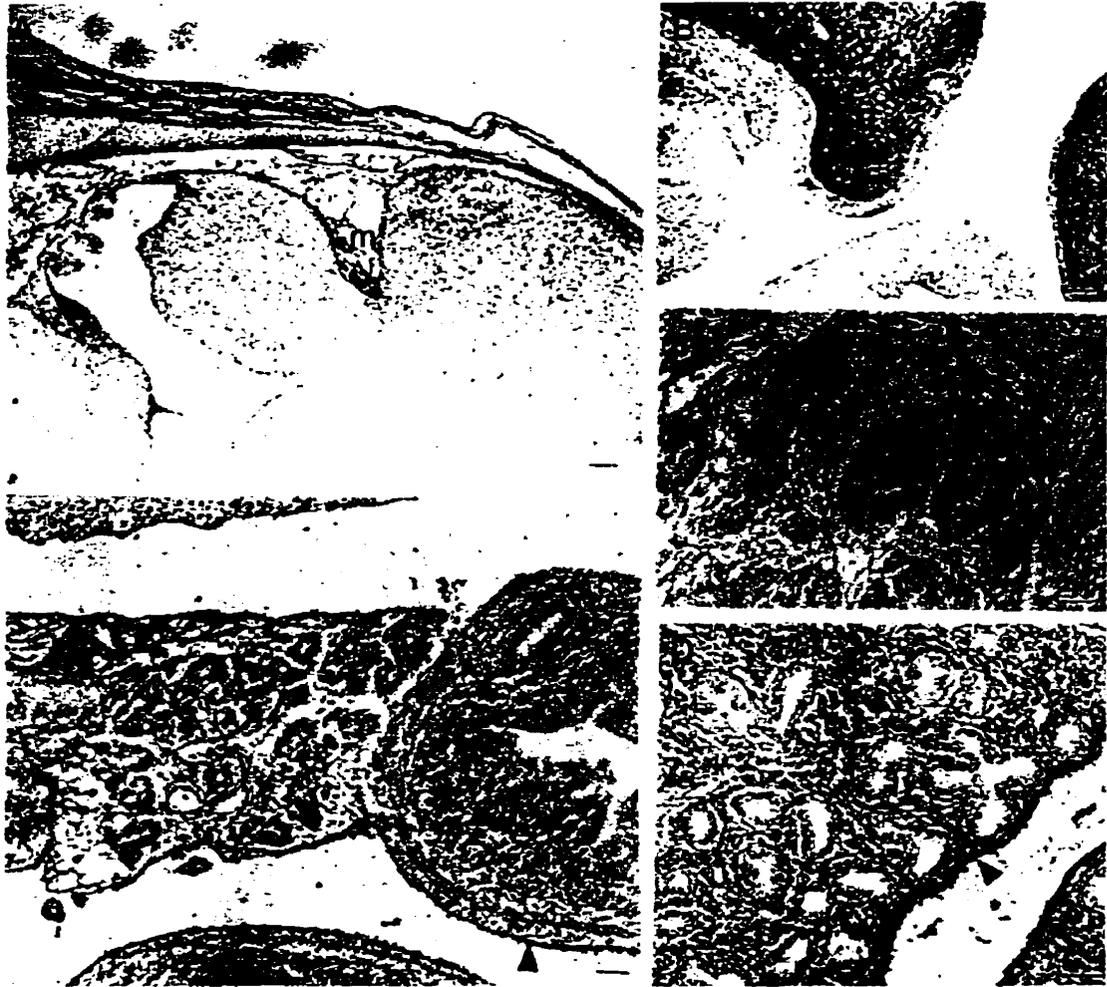
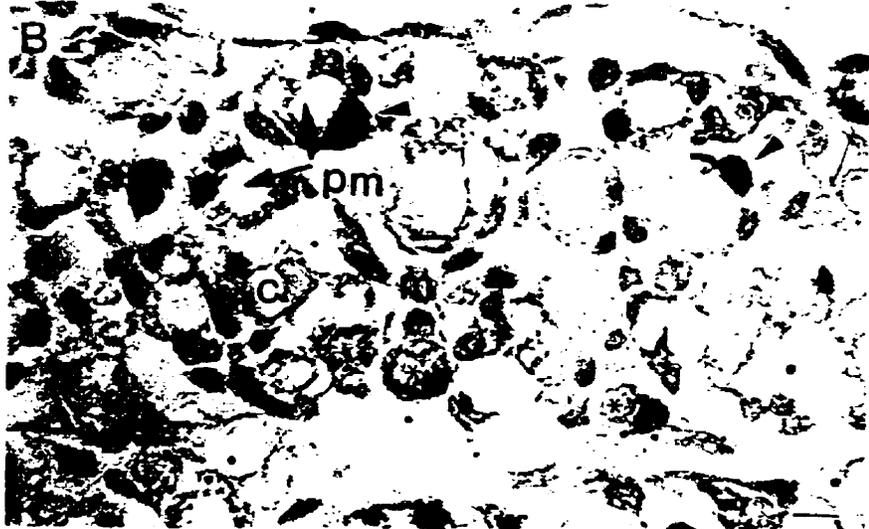


Figure 7



Figure 8



**Figure 9**

**CHAPITRE 3**

**GÉNÉRATION DE CELLULES DE SOUCHE EMBRYONNAIRE DE SOURIS**  
*bgp1 +/-*

## PRÉFACE

Les expériences décrites dans ce chapitre ont pour but de générer ultimement des souris *hgp1* *-/-*, afin de mieux définir le rôle de Bgp1. Les expériences présentées au chapitre précédent avaient pour but de déterminer le mode d'expression de cette protéine durant le développement embryonnaire de la souris. Ces données préliminaires permettent plusieurs hypothèses sur le rôle de Bgp1 durant l'embryogénèse et seront essentielles à l'élaboration d'une stratégie rationnelle pour évaluer le phénotype des souris *hgp1* *-/-*, lorsque celles-ci seront disponibles.

## INTRODUCTION

Les glycoprotéines biliaires sont des protéines membranaires faisant partie de la famille des Antigènes Carcinoembryonnaires (CEA), elle-même incluse dans la superfamille des Immunoglobulines (Ig) [1]. Chez la souris, il existe deux gènes similaires au *BGP* humain, soit *hgp1* et *hgp2*. L'épissage alternatif du gène *hgp1* génère plusieurs isoformes. La portion extracellulaire de cette protéine est constituée d'un domaine N-terminal similaire aux domaines variables des Ig et de un ou trois domaine(s) similaire(s) aux domaines constants des Ig. Cette glycoprotéine est ancrée à la membrane cellulaire par un domaine transmembranaire et possède une portion cytoplasmique de 10 ou 73 acides aminés [2, 3].

Bgp1 est présente du côté apical de l'épithélium du côlon, de l'endomètre et de la prostate [4, 5, 6]. Elle est également exprimée du côté apical des cellules des tubules rénaux et du côté canaliculaire des hépatocytes [7, 8]. Bgp1 est de plus présente du côté luminal de l'endothélium des capillaires, des artérioles et des veinules [9]. Plusieurs types de cellules hématopoïétiques expriment Bgp1: mégacaryocytes, plaquettes, leucocytes polynucléaires et mononucléaires, macrophages, lymphocytes B et lymphocytes T activés [1, 9]. Les fonctions physiologiques de Bgp1 dans ces organes et cellules sont encore imprécises.

L'expression de Bgp1 dans les cellules cancéreuses a été étudiée chez l'humain, le rat et la souris [1]. Bgp1 est régulée à la baisse dans plusieurs lignées cellulaires de carcinome du côlon ainsi que dans les tumeurs primaires du côlon chez les humains et les

souris [10, 11]. L'expression de Bgp1 est également diminuée dans les carcinomes de la prostate, de la vessie et du foie [1, 12].

Nous avons étudié l'expression de Bgp1 durant le développement embryonnaire de la souris (cf chapitre 2 de la présente thèse). Elle est très dynamique, ce qui suggère un rôle actif de Bgp1 durant l'embryogénèse de certains tissus. Bgp1 est exprimée dans le placenta et certains autres tissus extra-embryonnaires (trophoblastes géants, endoderme viscéral du sac vitellin) de même que dans les glandes endométriales et les cellules endothéliales de l'endomètre de l'utérus pendant toute la gestation. Bgp1 apparaît dans l'embryon à 8,5 *dpc* (*days post-coitum*), dans les cellules de l'épiderme; son expression y est maintenue jusqu'à la naissance. Bgp1 est exprimée dans le tube digestif à partir de 10,5 *dpc* et son mode d'expression suggère qu'elle pourrait être impliquée dans le processus de différenciation de l'épithélium gastro-intestinal. De plus, le patron d'expression de Bgp1 durant le développement de la souris suggère que cette protéine pourrait jouer un rôle dans la formation des myotubes secondaires, dans les interactions épithélio-mésenchymateuses de certains organes et dans les processus de sécrétion-réabsorption entre l'embryon et le liquide amniotique [13].

Plusieurs des fonctions documentées de Bgp1 suggèrent que cette protéine joue un rôle durant l'embryogénèse. Il est démontré que Bgp1 peut agir comme une molécule d'adhérence intercellulaire *in vitro* [8, 14-19]. Plusieurs molécules d'adhérence intercellulaire, comme par exemple la cadhérine E et les intégrines  $\beta_1$  [20] sont requises durant le développement embryonnaire. De plus, Bgp1 affecte à la baisse le potentiel de croissance des cellules tumorales [21, 22]. La modulation du potentiel de prolifération

cellulaire est un mécanisme essentiel à la morphogénèse normale de l'embryon. Parmi les autres fonctions suggérées pour Bgp1, la participation au transport transmembranaire des acides biliaires [23] et la transduction d'un signal extracellulaire [1, 24] sont également des processus omniprésents durant l'embryogénèse. Ceci n'exclut pas un rôle pour Bgp1 dans les tissus adultes normaux; au contraire, les multiples fonctions possibles de Bgp1 ainsi que sa présence dans plusieurs types de cellules dans l'organisme adulte le suggèrent fortement.

Une des techniques utilisées pour évaluer le rôle d'une protéine durant le développement embryonnaire et la vie adulte est l'ablation génique ("knock-out"). Cette technique permet de produire des organismes n'exprimant pas la protéine en question. Nous avons choisi d'inactiver le gène *hgp1* chez la souris. Brièvement, il faut d'abord introduire une mutation dans des cellules de souche embryonnaire provenant de souris 129Sv/J, dont la fourrure est agouti. La mutation devra inactiver l'un des allèles du gène de la protéine étudiée. Ces cellules mutantes sont ensuite microinjectées dans des blastulas de souris C57Bl/6, de fourrure noire. À la naissance, les souris chimériques ainsi produites sont identifiables à leur fourrure bicolore. Celles-ci sont ensuite croisées avec des souris de type sauvage. Si les cellules mutées ont participé à l'établissement de la population de cellules germinales des souris chimériques, on obtient des souris hétérozygotes pour la mutation désirée. Finalement, le croisement des hétérozygotes permet d'obtenir des souris homozygotes. Le phénotype de ces souris nous informe généralement du rôle physiologique du produit du gène inactivé [25].

L'inactivation d'un gène dans les cellules de souche embryonnaire est produite par la transfection dans ces cellules d'un vecteur de ciblage ("targeting vector") [25]. Celui-ci est composé d'un fragment du gène visé d'environ 6 kb, entrecoupé par une cassette contenant un gène permettant la sélection des cellules ayant intégré le vecteur (Figure 7). Les fragments d'ADN identiques au gène ciblé favorisent une recombinaison homologue entre le vecteur de ciblage et ce gène. L'omission d'un domaine important du gène, l'introduction de codons de terminaison dans la séquence codante ou même la simple présence de la cassette de sélection inactive le gène ciblé. Cette recombinaison homologue reste toutefois un événement assez rare [25].

Il est possible de rendre le processus de sélection plus efficace en ajoutant à une des extrémités de la construction (ou aux deux) une cassette contenant un gène de sélection négative [26]. Alors que l'intégration d'un gène de sélection positive rend les clones capables de résister à un agent de sélection, l'intégration d'un gène de sélection négative rend les clones sensibles à un agent de sélection n'affectant pas les cellules de type sauvage. Les insertions aléatoires du vecteur de ciblage se produisent le plus souvent par les extrémités de la construction; la cassette de sélection négative est alors intégrée au génome de la cellule, et ces clones, ne présentant pas l'événement génétique désiré, ne poussent pas en présence de l'agent de sélection négative. Par contre, la recombinaison homologue se produit nécessairement par crossing-over entre les portions homologues au gène visé du vecteur de ciblage et le gène visé. La cassette de sélection négative est éliminée par ce processus. Ces clones, présentant l'événement génétique recherché, peuvent donc croître en présence de l'agent de sélection négative (Figure 7).

Les expériences rapportées dans ce chapitre de la thèse visent à générer des cellules de souche embryonnaire *hgp1 +/-*, dans le but de générer des souris *hgp1 -/-*. Nous voulons générer ces souris afin de comprendre le rôle physiologique de *Bgp1*. Plusieurs expériences préliminaires révélèrent que *hgp1*, chez les souris 129 Sv/J, est légèrement différent dans sa région promotrice et dans ses introns du gène *hgp1* des souris BALB/c. L'efficacité d'un vecteur de ciblage est augmentée s'il est composé d'ADN exactement semblable à celui des cellules transfectées [31]. Le gène *hgp1* des souris 129 Sv/J fut donc cloné à partir d'une banque génomique de phage et utilisé pour la construction d'un vecteur de ciblage. L'électroporation de ce vecteur dans des cellules de souche embryonnaire permit d'isoler 1221 clones résistants à la néomycine dont aucun n'avait subi une recombinaison homologue.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

Lorsque non précisées, les molarités et compositions des tampons correspondent à celles décrites dans les protocoles standards [29].

### Analyses Southern

Huit  $\mu\text{g}$  d'ADN génomique de souris BALB/c, C57Bl/6, SJL/J ou 129Sv/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) ont été soumis à une digestion par les endonucléases de restriction EcoRI, BamHI ou HindIII. Les fragments furent séparés par électrophorèse, dans un gel de 0,8% d'agarose, dans un tampon TAE Boston (Tris 0,04M,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,0332M, EDTA 0,001M, pH 7,6), et ensuite transférés sur une membrane GeneScreen Plus (DuPont, NEN Research Products, Montréal, Canada). La composition de la solution d'hybridation est la suivante: SSPE 5X, solution de Denhardt 1X, 50% de formamide, 0,5% de SDS, 10% de sulfate de dextran, 100  $\mu\text{g/ml}$  d'ADN de testicule de saumon et  $1 \times 10^6$  cpm/ml de la sonde NcoI (Figure 1B) marquée au  $^{32}\text{P}$ . Les membranes furent soumises à une hybridation de 18 hres à 42°C. Les membranes furent ensuite lavées dans des solutions salines. La stringence finale des lavages fut celle d'une solution de SSC 0,1X et 0,1% SDS à 65°C.

### Sondes Marquées Radioactivement avec du $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP.

Les fragments de restriction utilisés pour générer les sondes furent séparés par électrophorèse dans des gels de 0,8% d'agarose "low melt". Les fragments furent excisés, dilués dans de l'eau et marqués avec du  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP par la méthode d'amorces aléatoires ("random priming") de Feinberg et Vogelstein [27]. La figure 1B illustre les positions des différentes sondes utilisées au cours de ces expériences.

### **Analyse Northern**

L'ARN total de foie de souris BALB/c et 129Sv/J fut extrait avec de l'isothiocyanate de guanidine, tel que décrit précédemment [16]. Cet ARN total fut séparé par électrophorèse, dans un gel de 1,5% d'agarose contenant de la formaldéhyde, dans un tampon composé d'acide morpholinopropanesulfonique (MOPS) 200 mM, de CH<sub>3</sub>COONa 50 mM et d'EDTA 10 mM, pendant 18 hres à 65 V. L'ARN fut ensuite transféré sur une membrane Hybond-N (Amersham, Chicago, IL). L'hybridation eut lieu dans une solution composée de: SSPE 5X, solution de Denhardt 5X, 50% formamide, 0,1% SDS, 5% sulfate de dextran, 150 µg/ml d'ADN de testicule de saumon et  $1 \times 10^6$  cpm/ml de la sonde ADNc (Figure 1B) marquée au <sup>32</sup>P pendant 18 hres à 42°C. La membrane fut ensuite lavée dans des solutions salines. La stringence finale fut celle d'une solution de SSC 0,1X et 0,1% SDS à 25°C.

### **Immunodétections**

Les fractions membranaires de protéines de foie et de côlon de souris BALB/c et 129Sv/J furent préparées tel que décrit précédemment [17]. Ces préparations de protéines (100 µg) furent séparées sur un gel de 8% de polyacrylamide en présence de SDS dans le tampon suivant: glycine 142 mM, Tris 25 mM et SDS 0,1%, pendant 18 hres, à 65 V. Les protéines furent ensuite transférées sur une membrane Immobilon et sondées avec soit une dilution 1/1000 d'un anticorps monoclonal de souris anti-Bgp1 de souris (CC1), suivie d'une incubation dans une dilution 1/50 d'un anticorps secondaire de lapin reconnaissant les IgG de souris [28], ou une dilution 1/1000 d'un anticorps

polyclonal anti-Bgp1 (231). La détection des complexes Ig fut faite à l'aide de protéine A marquée avec de l' $^{125}\text{I}$  (Amersham, Chicago, IL).

Les immunoprécipitations sont déjà décrites au chapitre 2 de ce mémoire.

### **Préparation d'ADNc par Réaction de Polymérisation en Chaîne (RT-PCR)**

La transcription inverse (RT) fut effectuée sur 25  $\mu\text{g}$  d'ARN total de foie de souris avec l'oligonucléotide KM5, complémentaire à une séquence se trouvant dans la région 3'NT des gènes *hgp1* et *hgp2*, à l'aide de l'enzyme de transcription inverse AMV (Life Sciences, St-Petersbourg, Fla) tel que décrit précédemment [17]. Les ADNc ainsi obtenus furent amplifiés par PCR avec l'oligonucléotide KM6, complémentaire à une séquence se trouvant dans la région 3'NT des gènes *hgp1* et *hgp2*, en amont (5') du site reconnu par l'oligonucléotide KM5 et l'oligonucléotide R46N1, complémentaire à une séquence se retrouvant uniquement dans la région N-terminale du gène *hgp1*, ou RNX1 complémentaire à une séquence se retrouvant uniquement dans la région N-terminale du gène *hgp2*. Le PCR fut effectué à l'aide de l'ADN polymérase Vent (New England Biolabs, Beverly, MA), dans les conditions suggérées par le fabricant. La température d'hybridation des amorces fut de 50°C pour 2 min. et la température de polymérisation fut de 72°C pour 2 min. pour un total de 30 cycles de polymérisation.

### **Autres Réactions de Polymérisation en Chaîne (PCR)**

Plusieurs réactions de PCR furent effectuées pour analyser les clones obtenus lors du criblage de la première banque génomique. Les réactions spécifiques au gène *hgp1* utilisèrent les amorces suivantes dans les conditions indiquées: PN4 et PN5, température d'hybridation des amorces: 50°C, pour 1 min., température de polymérisation: 72°C, pour

1 min., pour un total de 30 cycles, PN8 et RPN9, température d'hybridation des amorces: 50°C, pour 1 min., température de polymérisation: 72°C, pour 1 min., pour un total de 30 cycles, 46N1 et PN8, température d'hybridation des amorces: 53°C, pour 1 min., température de polymérisation: 72°C, pour 1 min., pour un total de 40 cycles, KM1 et 33-35, température d'hybridation des amorces: 53°C, pour 2 min., température de polymérisation: 72°C, pour 2 min., pour un total de 30 cycles. Les réactions spécifiques au gène *hgp2* utilisèrent les amorces RNX1 et RA2NX dans les conditions suivantes: température d'hybridation des amorces: 50°C, pour 1 min., température de polymérisation: 72°C, pour 1 min., pour un total de 30 cycles. Les réactions spécifiques au gène *cea10* utilisèrent les amorces BGP3N et RBGP3N dans les conditions suivantes: température d'hybridation des amorces: 50°C, pour 1 min., température de polymérisation: 72°C, pour 1 min., pour un total de 30 cycles. PN4, PN5, PN8, RPN9 et 46N1 sont complémentaires à des séquences se retrouvant dans le domaine N-terminal du gène *hgp1*. KM1 et 33-35 reconnaissent respectivement des séquences se trouvant dans les domaines B1 et A2 du gène *hgp1* (Figure 6). Les oligonucléotides RNX1 et RA2NX sont complémentaires à des séquences se retrouvant dans le domaine N-terminal du gène *hgp2*. BGP3N et RBGP3N reconnaissent des séquences se trouvant dans le premier domaine N-terminal du gène *cea10*.

La longueur des introns fut vérifiée à l'aide des oligonucléotides suivants: R46N1 et KM7 (deuxième intron), KM8 et RKM1 (troisième intron), KM1 et 33-35 (quatrième intron) et 33-53 et SP6 (distance entre site HindIII et la fin de l'exon A2). Ces oligos hybrident dans les exons flanquants un intron et sont orientés de façon à amplifier un

fragment contenant la totalité de cet intron. La température d'hybridation des amorces fut de 50°C pour 1 min. et la température de polymérisation fut de 72°C pour 1 min. 30 sec., pour un total de 30 cycles de polymérisation.

Le fragment RSL2B-SL3, utilisé dans la construction vecteur de ciblage, fut généré par PCR de la façon suivante. Une première réaction avec les oligonucléotides RSL2 et SL3 fut effectuée à une température d'hybridation des amorces de 60°C pour 1 min. et à une température de polymérisation de 72°C pour 1 min. 30 sec., pour un total de 30 cycles de polymérisation, en utilisant comme brin modèle le fragment BamHI de 2.2 kb du gène *hgp1* de souche 129Sv/J (Figure 2). Par séquençage, il fut vérifié que l'une des mutations désirées était présente (i.e. l'introduction d'un site XhoI) mais pas l'autre (i.e. introduction des deux codons de terminaison). Un troisième oligonucléotide (RSL2B) fut donc conçu et une réaction PCR fut effectuée avec les amorces RSL2B et SL3 en utilisant comme brin moule le produit de la réaction de PCR précédente, dans les conditions suivantes: température d'hybridation des amorces: 60°C pour 1 min., température de polymérisation 72°C pour 1 min., pour un total de 30 cycles.

### **Séquencage de l'ADN**

Les fragments obtenus par PCR furent sous-clonés dans le vecteur pCR-Script SK+ (Stratagene) selon le protocole recommandé par le fabricant. Leurs séquences furent déterminées par la technique de terminaison de chaînes en utilisant le système de séquençage de Pharmacia, avec une série d'oligonucléotides spécifiques à *hgp1*. Les séquences nucléotidiques ainsi obtenues furent analysées à l'aide du programme DNasis de Pharmacia.

## Liste des Oligonucléotides

RT-PCR:

KM5 (antisens): 5'- TTGATACCTCACTCTCAGCCA - 3',  
KM6 (antisens): 5'- GGCTCCAGGATCCACCTTTTCTTC - 3',  
R46N1 (sens): 5'- CCAAATGATCACCATGAAG - 3',  
RNX1 (sens): 5'- ATGGCTTTTCCACTCCACGC - 3'.

SÉQUENÇAGE ET LONGUEUR DES INTRONS ET ANALYSE DES CLONES DE LA PREMIÈRE BANQUE GÉNOMIQUE:

33-35 (antisens): 5'- CCGGCATCTTCCCTCTTAATAGGGTCTATTCTG - 3',  
33-53 (sens): 5'- AGAATAGACCCTATTAAGAGGGGAAGATGCCGG - 3',  
KM1 (sens): 5'- CCTCCCAAGAGCTCTTTATC - 3',  
RKM1 (antisens): 5'- GATAAAGAGCTCTTGGGAGG - 3',  
KM7 (antisens): 5'- GGGTCACTTCGGTTGACACT - 3',  
KM8 (sens): 5'- CCAGTGAGTGTCAACCGAAG - 3',  
KMIT2 (sens): 5'- GGGAAAGTGACCAGCGAGATC - 3',  
IRR1 (antisens): 5'- AGTGAGGAACAGAAT - 3',  
PN4 (sens): 5'- GTCACCATTGAGGCTGTGCCG - 3',  
PN5 (antisens): 5'- TACATGAAATCGCACAGTCGC - 3',  
PN8 (sens): 5'- CTGCCCTGGCGCTTGA - 3',  
RPN9 (antisens): 5'- TTGCCCCGTGAAATTCAT - 3',  
BGP3N (sens): 5'- ATGCCGCAGACGCTCCGAGTC - 3',  
RBGP3N (antisens): 5'- GAAATCGGAGTAATTTCAA - 3',  
SI.1 (sens): 5'- GTAGTGTGGAGAAGAAGCT - 3',  
RSL1 (antisens): 5'- AGCTTCTTCTCCAACACTAC - 3',  
SL4 (sens): 5'- GAGAGTTGCAAAGGTCC - 3',  
PGKneo2 (sens): 5'- CCTTCTATCGCCTTCTTGACG - 3',  
RPGKneo3 (antisens): 5'- GCACAGCTGCGCAAGGAACGC - 3',  
RPGKneo4 (antisens): 5'- CGCCGTCGGGCATGCGCGCCTTGA - 3',  
RCGM2N (antisens): 5'- GTCTTATTAGTGCCTGTTAC - 3',  
RA2NX (antisens): 5'- GATTAGAAGAGTATCATTGTT - 3',  
T<sub>3</sub>: 5'- ATTAACCCTCACTAAAG - 3',  
T<sub>7</sub>: 5'- TAATACGACTCACTATAGGG - 3',  
SP6: 5'- GATTTAGGTGACACTATAG - 3'.

VECTEUR DE CIBLAGE:

RSL2(antisens): 5'- CTCAATGGTGACTCGAGCAGTGGTGGCAGGTCATCAGGA  
GGC - 3',  
RSL2B(antisens): 5'- GACTCGAGCAGTGGTGGCAGGTCATCAGGAG - 3',  
SL3(sens): 5'- CGGAGTATGTTCTAGAACACTG - 3'.

## Criblage des Banques Génomiques

La première banque génomique utilisée était constituée d'ADN de rein de souris 129Sv/J femelle, partiellement digéré avec l'endonucléase de restriction Sau3A. Les fragments de 10-15 kb ainsi produits furent insérés dans le site BamHI de phage  $\lambda$  Dash. Cette banque fut gracieusement offerte par Dr Michel Tremblay, Dpt Biochimie, McGill. Une quantité totale de phages de  $1,4 \times 10^6$  unités formant des plages de lyses (pfu) fut étalée comme il est décrit plus en détails pour la deuxième banque plus bas. Cette banque fut analysée avec les sonde NcoI et ADNc (Figure 1B).

La deuxième banque génomique utilisée était constituée d'ADN de cellules ES Sv129D3 partiellement digéré avec l'endonucléase de restriction MboI. Les fragments de 10-15 kb ainsi produits furent insérés dans le site BamHI de phage  $\lambda$ GEM12. Cette banque fut gracieusement offerte par les Dr Christian Benoît et Diane Mathis (Strasbourg, France). La bactérie hôte est la souche LE 392 P2. Les bactéries compétentes furent préparées selon le protocole décrit par Maniatis [29]. Une quantité totale de phages de  $7 \times 10^5$  pfu fut étalée comme le décrit Maniatis [29]. Les plages de lyses furent transférées sur des membranes Nitran + (Schleicher & Schuell, Xymotech Biosystems, Montréal, Canada), tel que décrit par Maniatis, en trois exemplaires.[29] Les membranes furent soumises à une hybridation avec les sondes NcoI, ADNc et TaqI (Figure 1B) et lavées dans les conditions décrites plus haut pour les analyses Southern. Les phages hybridant avec l'une et/ou l'autre des sondes furent récupérés, tel que décrit par Maniatis (Tableau 1) [29]. Ceux qui furent purifiés furent réétalés à une confluence permettant de récolter une plage de lyse unique, après identification des plages positives

par le processus décrit ci-haut. Ces étapes furent répétées jusqu'à l'obtention d'un clone pur, i.e. dont toutes les plages de lyse hybridèrent avec la sonde.

### **Préparation d'ADN de Phages**

Les phages qui hybridèrent avec les trois sondes furent analysés par Southern avant leur purification. Brièvement, leur ADN fut soumis à des digestions avec l'endonucléase de restriction BamHI ou EcoRI et analysé par analyses Southern avec la sonde NcoI. Les phages dont l'ADN présentait les fragments de restriction typiques de *hgpI* furent purifiés. Les petites préparations d'ADN de phages furent effectuées avec le système de "miniprep" de phage de Qiagen (Chatsworth, CA) selon les instructions du fabricant.

Le phage qui se révéla contenir *hgpI* fut purifié. Une préparation d'ADN ("Large Prep") de ce phage fut effectuée. Brièvement, un litre de culture de phage fut inoculé avec  $10^{10}$  phages et  $2.5 \times 10^9$  bactéries compétentes à 37°C jusqu'à lyse complète (18h). La culture fut ensuite incubée 30 min. en présence de 5 ml de  $\text{CHCl}_3$ . La phase aqueuse fut ensuite centrifugée à 7000 rpm dans un rotor GS3 (10 000 g), 20 min., et 60 g/l de NaCl et 70 g/l de PEG 8000 furent ajoutés au surnageant afin de précipiter les phages. La suspension fut incubée 4 hres à 4°C et centrifugée à 9000 rpm dans un rotor GS3 (14 000 g), 20 min.. Le culot de phages fut resuspendu dans 10 ml de solution  $\lambda$ Dil ( NaCl 0,1 M,  $\text{MgCl}_2$  10 mM et Tris 50 mM pH 7,4) auxquels furent ajoutés 7,5 g de CsCl. Cette solution de phages fut ensuite soumise à une centrifugation à 40 000 rpm dans un rotor VTi80 (127 000 g) (Beckmann) pendant 18 hres. Une bande de phages fut ensuite retirée du tube. Ces phages furent dialysés contre 4 litres de solution  $\lambda$ Dil pendant 18

hres. L'ADN de phages fut ensuite préparé par extraction avec du phénol, un mélange 24:1 de chloroforme et d'alcool isoamyl, et de l'éther. L'ADN fut ensuite précipité avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3M et 3 volumes d'éthanol absolu, rincé avec de l'éthanol à 70%, séché et resuspendu dans un tampon TE.

### **Construction du Vecteur de Ciblage**

Deux fragments du phage comprenant le gène *hgp1* furent sous-clonés dans le vecteur pcDNAII (InVitrogen): un fragment BamHI de 2,3 kb et un fragment BamHI-HindIII d'environ 6 kb. (Figure 2A)

Une cassette contenant le gène de résistance à la néomycine (*neo<sup>r</sup>*) sous le contrôle d'un promoteur de phosphoglycérate kinase (PGK) et suivi d'un signal de polyadénylation de SV40 (gracieusement offerte par le Dr Michel Tremblay) fut également clonée dans le vecteur pcDNAII dans les sites XhoI et BamHI.

Les oligonucléotides SL3 et RSL2B furent utilisés pour amplifier par réaction de polymérisation en chaîne un fragment de 1,1 kb commençant au début du 5'NT de *hgp1* et se terminant dans son 2e exon (voir ci-haut), à la fin du leader, en introduisant deux codons de terminaison (TGA) dans le cadre de lecture et un site XhoI à la fin de celui-ci. D'abord cloné dans le vecteur pCR-Script SK+ (Figure 2B), ce fragment fut ensuite retiré de ce vecteur avec l'endonucléase de restriction XhoI et cloné dans le site XhoI du vecteur pcDNAII contenant déjà la cassette *neo<sup>r</sup>* (Figure 2C). La bonne orientation de l'insertion et la conservation du cadre de lecture furent vérifiées par séquençage. Une digestion avec BamHI permet alors de retirer un fragment correspondant au morceau amplifié par PCR et à la cassette *neo<sup>r</sup>*, qui fut ensuite cloné dans le site BamHI du vecteur

pcDNAII contenant déjà le fragment BamHI-HindIII de 6 kb de *bgp1* (Figure 2D). À nouveau, la bonne orientation de l'insertion fut confirmée par séquençage. Cette construction correspond au vecteur de ciblage sans sélection négative.

Une cassette contenant le gène de la thymidine kinase (TK) sous le contrôle du promoteur PGK (gracieusement offerte par le Dr Michel Tremblay) fut clonée dans le site HindIII du vecteur pcDNAII contenant la construction complète. La présence de ce gène dans une cellule rend cette dernière sensible au gancyclovir. Cette construction correspond au vecteur de ciblage avec sélection négative

### **Transfection des Cellules de Souche Embryonnaire et Sélection des Recombinants**

Le vecteur de ciblage fut linéarisé par les endonucléases de restriction NotI ou HindIII.  $1 \times 10^7$  cellules de souche embryonnaire de souris 129Sv/J RW4 (Genome Systems) ou J1 (gracieusement offertes par le Dr Michel Tremblay) furent resuspendues dans 1 ml du tampon d'électroporation suivant: HEPES 20 mM pH 7,55, NaCl 137 mM, KCl 5mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,7 mM, dextrose 6 mM. 25  $\mu\text{g}$  du vecteur de ciblage linéarisé furent ajoutés. Ces cellules furent ensuite soumises à une électroporation (240 mV, 500  $\mu\text{Fa}$ ). Les cellules ainsi traitées furent ensuite cultivées sur une couche de cellules nourricières (des fibroblastes d'embryon de souris mitotiquement inactifs) dans un milieu D-MEM (Life Technologies, Grand Island, NY) enrichi de sérum foetal de veau (HyClone Laboratories, Logan, Utah) (concentration finale: 15%), de pénicilline-streptomycine (Life Technologies, Grand Island, NY) (concentration finale: 50U/ml pénicilline, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycine), d'acides aminés non-essentiels (Life Technologies, Grand Island, NY) (concentration finale: 0,1 mM), de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Life

Technologies, Grand Island, NY) (concentration finale:  $1 \times 10^{-4}$  M) et du Facteur d'Inhibition de la Leucémie murine (LIF) (Life Technologies, Grand Island, NY) (concentration finale: 1000 U/ml). Après 24 hres, le(s) agent(s) de sélection furent ajoutés au milieu: néomycine (G418) (Life Technologies, Grand Island, NY) (concentration finale: 300  $\mu$ g/ml actif) et gancyclovir (concentration finale: 2mM), selon le vecteur utilisé. Après 6-7 jours de sélection les colonies résistantes furent manuellement sélectionnées et clonées. Les clones furent dupliqués deux jours plus tard. Après encore deux jours, un des exemplaires des clones fut resuspendu dans un milieu propice à la congélation (10% DMSO, 20% FBS) et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'autre exemplaire fut cultivé à confluence et l'ADN fut extrait des cellules selon le protocole suivant. Les cellules furent laissées dans les plats de 96 puits. Le milieu fut enlevé et les cellules furent rincées deux fois avec une solution PBS. Le tampon de lyse (50  $\mu$ l) fut ajouté aux cellules dans leurs puits (composition: Tris pH 7,4 10mM, EDTA 10mM, NaCl 10mM, Sarcosyl 0,5%, protéinase K 1mg/ml.). Celles-ci furent ensuite incubées à  $60^{\circ}\text{C}$  dans une chambre humide pendant 18 hres. L'ADN fut précipité par l'ajout de 100  $\mu$ l d'éthanol 100%, NaCl 75mM, suivi d'une incubation de 2 hres à  $25^{\circ}\text{C}$ . Il fut rincé trois fois avec de l'éthanol 70 %, séché, et soumis à une digestion par 10 U de l'endonucléase de restriction EcoRI ou BamHI dans le tampon recommandé par le fournisseur, en présence de BSA (100 $\mu$ g/ml), de RNase (100 $\mu$ g/ml) et de spermidine (1mM). Cet ADN fut analysé par buvardage Southern avec la sonde NcoI (Figure 1B).

### **Préparation des Cellules Nourricières**

Les cellules nourricières furent préparées à partir de fibroblastes d'embryons de souris 129Sv/J *neo<sup>f</sup> +/+* comme le décrit E. J. Robertson [30]. Brièvement, des embryons de 13,5 *dpc* sont désagrégés par digestion avec de la trypsine (Life Technologies, Grand Island, NY)(concentration: 0,25%) pendant 2 heures à 37°C. Ces cellules furent étalées dans un pétri de 150 mm (un plat par embryon), dans un milieu  $\alpha$ -MEM enrichi de sérum foetal bovin (FBS) (10%) et de L-glutamine (Life Technologies, Grand Island, NY) (concentration finale: 2 mM). Après 24 heures, les plats sont rincés 2 ou 3 fois avec du PBS afin de se débarrasser des débris. Les cellules ayant adhéré sont amplifiées pendant 4 ou 5 passages, puis sont incubées 2 heures dans du milieu de culture contenant de la mitomycine (Sigma, St-Louis, MO) (concentration: 10  $\mu$ g/ml). Les cellules sont ensuite récoltées puis étalées dans des plats gélatinisés à une confluence de 15 000 cellules/cm<sup>2</sup> environ.

## RÉSULTATS

La séquence et l'organisation génomique de *hgp1* furent déterminées par l'équipe de Nicole Beauchemin en utilisant le matériel génétique des souris de souche BALB/c [2]. Les cellules de souche embryonnaire à notre disposition pour la suite des expériences étaient de souche 129Sv/J. Il est démontré que le taux de recombinaison homologue entre un vecteur de ciblage et le génome de la cellule transfectée est augmenté si ce vecteur est construit à partir d'ADN isogénique à celui de la cellule [31]. Il existe une souche de souris (SJL/J) qui possède un allèle de *hgp1* différent de celui des souris BALB/c (i.e. *hgp1<sup>b</sup>*) [3]. Le produit de cet allèle est incapable de remplir la fonction de récepteur viral de Bgp1 [32]. Il était donc important de vérifier que le gène *hgp1* des souris 129Sv/J était identique à celui que nous avons déjà cloné chez les souris BALB/c. La première partie des expériences décrites dans ce chapitre est donc destinée à étudier le gène *hgp1* chez la souris 129Sv/J.

### Caractérisation Génomique de *hgp1* chez les Souris 129Sv/J

Tout d'abord, le patron de restriction des gènes *hgp* chez les souris de souche 129Sv/J fut déterminé. Celui-ci était déjà connu pour les souris de souche BALB/c, C57Bl/6 et SJL/J [3]. Les fragments *hgp1* de 129Sv/J produits par les endonucléases EcoRI et BamHI sont les mêmes que ceux de BALB/c (Figure 3, comparer les pistes A et D des endonucléases EcoRI et BamHI). Par contre, pour la souche 129Sv/J, l'endonucléase de restriction HindIII produit un fragment *hgp1* d'environ 8 kb alors que

celui de la souche BALB/c n'est que de 1 kb (Figure 3, comparer les pistes A et D de l'endonucléase HindIII). L'utilisation de la sonde TaqI (Figure 1B), spécifique à l'exon A2 du gène, a permis de déterminer que la différence provient de la disparition d'un site HindIII dans le premier intron de *bgp1* (Figure 6). Ceci fut confirmé plus tard par séquençage du gène *bgp1* obtenu de la banque génomique (voir ci-bas). Les fragments du gène *bgp1* générés par ces digestions sont illustrés à la figure 1A. Il est également intéressant de noter que les fragments correspondant à *bgp2* pour la souche 129Sv/J sont différents de ceux de la souche BALB/c pour les trois endonucléases de restriction utilisés. Les souris 129Sv/J montrent donc des polymorphismes pour le locus *bgp*, le gène *bgp1* étant le moins affecté par ces changements.

#### **Expression de l'ARNm de *bgp1* chez les souris 129Sv/J**

La différence entre les fragments de restriction de *bgp1* chez les deux souches étudiées aurait pu être révélatrice de différences plus importantes, qui auraient pu affecter l'expression de ce gène chez les souris 129Sv/J. En premier lieu, l'expression de *Bgp1* fut vérifiée au niveau transcriptionnel. La présence de l'ARNm de *bgp1* dans le foie des souris 129Sv/J fut confirmée par analyse Northern (Figure 4). En effet, la sonde correspondant à l'ADNc complet (Figure 1B) révèle la présence de deux ARNm de 2 kb et 4 kb dans l'ARN de foie de souris 129Sv/J (Figure 4, piste D). Ces ARNm sont également visibles dans l'ARN de côlon et de foie de souris BALB/c (pistes A et B, figure 4), qui servent de contrôles positifs. Ceux-ci correspondent aux ARNm des isoformes de *Bgp1* possédant 1 et 3 domaines Ig constants respectivement. L'identité des

différents ARNm fut définie précédemment par notre groupe de recherche en utilisant des sondes spécifiques à chacun des exons de *bgp1* [33].

En deuxième lieu, le clonage de l'ADNc de *bgp1* par RT-PCR permet de déterminer que la séquence codante de ce gène est identique chez les souches BALB/c et 129Sv/J. Il existe cependant quelques petites différences dans la région 3'NT (6 nucléotides dans la portion clonée) (Figure 6).

L'ADNc du gène *bgp2* de la souche 129Sv/J fut lui aussi isolé avec la même technique. Il fut partiellement séquencé et sa séquence fut comparée à celle du gène *bgp2* des souris de souche BALB/c. Au moins 2 nucléotides de la région N-terminale du gène *bgp2* chez les souris de souche 129Sv/J sont différents de ceux du gène *bgp2* de souche BALB/c.

#### **Expression de la Protéine Bgp1 chez les Souris 129Sv/J**

Nous avons vérifié l'expression de la protéine Bgp1 dans le foie et le côlon des souris 129Sv/J par immunodétection. En utilisant l'anticorps monoclonal CC1, nous avons décelé une protéine de 110 kDa dans le foie des souris 129Sv/J (Figure 5, piste B) et plusieurs protéines dans le côlon, dont la plus importante est de 140 kDa (Figure 5, piste A). Cette différence entre les poids moléculaires de l'isoforme le plus long de Bgp1 dans le foie et le côlon a déjà été observée [10]. Elle correspondrait à une différence de la glycosylation pour Bgp1 dans ces deux organes. Les protéines d'environ 95 et 70 kDa observées dans la piste A correspondent respectivement à un produit protéolytique de Bgp1 et à l'isoforme de cette protéine ne comprenant qu'un seul domaine constant des Ig.

Ces expériences démontrent que *Bgp1* est normalement exprimée chez les souris 129Sv/J.

### **Isolement et Caractérisation du Gène *bgp1* des Souris 129Sv/J**

Malgré la conservation de la séquence codante entre les deux souches, il restait possible que des différences importantes existent entre les promoteurs et/ou les introns du gènes *bgp1* des souris 129Sv/J et BALB/c. Nous avons donc pris la décision de cribler une banque génomique de souris 129Sv/J afin d'obtenir le gène *bgp1* de cette souche. Cela permettrait de construire le vecteur de ciblage en utilisant de l'ADN isogénique aux cellules de souche embryonnaire 129Sv/J que nous allons utiliser, et de favoriser ainsi un meilleur taux de recombinaison homologue [31].

Deux banques de phages furent criblées pour finalement obtenir le gène *bgp1* de la souche 129Sv/J. La première fut criblée à deux reprises. Les sondes NcoI et cDNA (Figure 1) furent utilisées et permirent d'isoler 20 clones doublement positifs et 59 clones positifs uniquement avec la sonde ADNc. Des analyses subséquentes (analyses Southern, sous-clonage et séquençage de fragments de clones purifiés et réaction de polymérisation en chaîne) permirent d'identifier quelques-uns de ces clones, dont quatre se révélèrent comporter le gène *cea 10* de la souche 129Sv/J. De plus, trois des clones isolés à partir de cette banque hybridaient avec la sonde N-terminale (Figure 1), spécifique au gène *bgp1*. Le séquençage de fragments de ces clones ainsi que des réactions de polymérisation en chaîne ("PCR") avec des oligonucléotides choisis pour amplifier les introns du gène *bgp1* révélèrent que ces clones étaient dépourvus d'introns. Ils correspondaient donc probablement à des pseudogènes.

La deuxième banque de phages utilisée fut criblée avec trois sondes différentes. Les sondes NcoI, TaqI et ADNc furent choisies (Figure 1). Comme NcoI et TaqI reconnaissent des régions du gène *hgp1* se trouvant aux extrémités 5' et 3' de la région dont nous avons besoin, nous augmentions ainsi la probabilité d'isoler des clones contenant toute la région nécessaire. De plus, les sondes ADNc et TaqI sont plus spécifiques à *hgp1*, alors que NcoI reconnaît les trois gènes *hgp1*, *hgp2* et *cea10*. Nos chances d'obtenir *hgp1* parmi les triples positifs étaient ainsi augmentées, sans exclure la possibilité d'obtenir les deux autres gènes. Les résultats du criblage de la deuxième banque de phage sont rapportés au tableau 1. Le processus de sélection mis en évidence cinq clones dont l'ADN hybridait avec ces trois sondes. De ces cinq clones, caractérisés par des analyses Southern avant leur purification, deux révélèrent le patron de restriction typique de *hgp1* chez les souris 129Sv/J. Ces clones furent purifiés et des fragments d'un de ces deux clones furent sous-clonés et soumis à des analyses de séquence pour confirmer leur identité (Figure 2A). Ils furent ensuite utilisés pour construire le vecteur de ciblage.

Quelques analyses supplémentaires du gène *hgp1* de souche 129Sv/J furent effectuées à partir de ce clone.

D'abord, les exons comprenant les région 5'NT et N-terminale du gène furent séquencés (Figure 6). Cette analyse révéla quelques différences entre la séquence de la région 5'NT de BALB/c et celle de 129Sv/J (4 nucléotides sont différents). Cette information était nécessaire pour concevoir les oligonucléotides complémentaires à ces régions utilisés dans la construction du vecteur de ciblage. L'intron se trouvant entre le

premier et le deuxième exon du gène *bgp1* fut également soumis à une analyse de séquence pour confirmer la disparition du site de reconnaissance de l'endonucléase de restriction HindIII, déjà révélée par des analyses Southern (voir ci-haut).

Ensuite, la longueur des introns du gène *bgp1* de la souche 129Sv/J fut évaluée en utilisant la technique de réaction de polymérisation en chaîne avec des oligonucléotides choisis pour amplifier les introns de ce gène. Les longueurs de ces introns se révélèrent être les mêmes que celles des introns du gène *bgp1* de la souche BALB/c, précédemment déterminées dans notre laboratoire (Figure 6) [2].

### **Conception du Vecteur de Ciblage**

Les vecteurs de ciblage que nous avons construits sont illustrés à la figure 7. Ceux-ci sont conçus pour que, dans l'allèle recombiné de *bgp1*, le domaine N-terminal soit remplacé par une cassette contenant un gène de résistance à la néomycine (*neo<sup>r</sup>*). Nous avons choisi d'enlever cet exon pour deux raisons. D'abord, il est présent dans tous les isoformes de Bgp1 générés par épissage alternatif [17]. La possibilité que le gène soit transcrit et que l'exon inactivant soit épissé s'en trouve donc considérablement réduite. Ensuite, ce domaine est essentiel à plusieurs des fonctions décrites pour Bgp1. En effet, les fonctions d'adhérence intercellulaire et de site de liaison du virus de l'hépatite murine sont toutes deux dépendantes du domaine N-terminal de cette protéine [1, 28]. Donc, même si ce gène mutant était quand-même transcrit et traduit, la protéine résultante serait incapable de remplir au moins certaines des fonctions normales de Bgp1. Afin de minimiser la possibilité qu'un ARNm mutant de *bgp1* soit traduit, nous avons également choisi d'inclure deux codons de terminaison (TGA) à la fin de la région leader

de *bgp1*, dans le cadre de lecture. Ces mutations furent introduites en effectuant une réaction de polymérisation en chaîne avec des oligonucléotides similaires à *bgp1*, mais légèrement modifiés de façon à ce que le produit de la réaction de polymérisation contienne deux codons TGA dans le cadre de lecture.

Nous avons construit deux versions de ce vecteur, dont l'une comprend un gène PGK-TK permettant la sélection négative (Figure 7). Les deux versions du vecteur furent utilisées dans les expériences d'électroporation décrites plus bas.

#### **Génération des Cellules de Souche Embryonnaire *bgp1 +/-***

La première étape nécessaire pour produire une lignée de souris dont un des gènes est inactivé est la génération de cellules de souche embryonnaire hétérozygotes pour la mutation désirée. On génère ces cellules en les transfectant avec un vecteur de ciblage capable d'inactiver spécifiquement le gène désiré. Dans notre cas, la transfection fut effectuée par électroporation, et deux versions du vecteur de ciblage, avec ou sans gène permettant la sélection négative, furent utilisées. Plusieurs lignées de cellules de souche embryonnaire furent ainsi transfectées. L'évaluation de l'événement de recombinaison dans les clones obtenus se fit par des analyses Southern, avec l'endonucléase de restriction EcoRI. En effet, la cassette *neo<sup>r</sup>* contenant un site de restriction EcoRI, le fragment EcoRI caractéristique de *bgp1* est déplacé de 12 kb (normal) à 2,7 kb (muté) si le vecteur de ciblage se recombine avec *bgp1*. Le tableau 2 résume les expériences réalisées et les résultats obtenus.

La transfection fut tentée avec succès à cinq reprises. Un total de 1221 clones ayant survécu au processus de sélection furent analysés. La figure 8 montre un exemple

des résultats obtenus par ces analyses. La flèche indique la position calculée du fragment caractéristique d'un clone *bgpl* +/- . Aucun des 1221 clones ne s'avéra avoir subi l'intégration du vecteur de ciblage par recombinaison homologe avec le gène *bgpl*. Nous n'avons donc pas réussi à générer de cellules de souche embryonnaire *bgpl* +/- en utilisant les vecteurs décrits plus haut.

Une des hypothèses possibles pour expliquer cet échec était que Bgpl soit exprimée dans les cellules de souche embryonnaire. Sa fonction aurait alors pu être importante pour ces cellules au point que l'inactivation d'un seul allèle *bgpl* compromette la survie de ces cellules. Afin d'écarter cette possibilité, nous avons évalué l'expression de Bgpl dans les cellules de souche embryonnaire par des immunoprécipitations suivies d'immunodétections avec un anticorps polyclonal anti-Bgpl (231). Ces analyses révélèrent que les cellules de souche embryonnaire n'expriment pas Bgpl (Figure 9, piste B). Il est donc improbable que l'absence de clone *bgpl* +/- soit due à un effet de cette mutation sur la survie des cellules de souche embryonnaire.

L'analyse des clones positifs comporterait plusieurs autres étapes. En effet, les clones ayant subi une recombinaison homologe doivent également n'avoir qu'une seule insertion du vecteur de ciblage pour pouvoir être utilisés dans la suite des expériences, puisque des insertions multiples du vecteur de ciblage pourraient entraîner chez les souris mutantes des phénotypes qui ne dépendraient pas de l'inactivation du gène étudié mais de l'inactivation d'un autre gène. L'insertion unique est vérifiée par analyse Southern, en utilisant une sonde spécifique au gène *neo<sup>r</sup>*. Des insertions multiples du vecteur de

ciblage dans le génôme d'un clone sont révélées par l'apparition de plus d'un fragment hybridant avec cette sonde.

## DISCUSSION

Le but de ces expériences était de générer des cellules de souche embryonnaire qui permettraient de produire des souris *hgp1*<sup>-/-</sup>. Nous croyons que ces souris, qui ne pourraient exprimer Bgp1, nous fourniraient de précieuses informations sur la fonction physiologique de cette glycoprotéine.

Des études préliminaires sur le gène *hgp1* chez les souris de souche 129 Sv/J démontrèrent qu'il existait des différences dans ce gène entre les souris de souche BALB/c et 129Sv/J. Comme les cellules de souche embryonnaire à notre disposition sont de souche 129Sv/J, que le gène *hgp1* déjà isolé par notre groupe de recherche était de souche BALB/c, et que l'efficacité d'un vecteur de ciblage est augmentée s'il est fait d'ADN exactement semblable à celui des cellules transfectées [31], nous avons choisi de d'abord isoler le gène *hgp1* de la souche 129Sv/J en criblant une banque génomique de phage.

Cet ADN fut ensuite utilisé pour la construction de deux vecteurs de ciblage (Figures 2 et 7). Ceux-ci furent insérés dans des cellules de souche embryonnaire par

électroporation. Il fut impossible d'isoler un clone de cellule de souche embryonnaire *bgp1 +/-*.

### **Les Gènes *bgp1* et *bgp2* chez les Souris de Souche 129Sv/J**

Les analyses Southern que nous avons d'abord effectuées démontrent clairement l'existence de polymorphismes dans les gènes *hgp* entre les souris de souche 129Sv/J et BALB/c. Ces différences, pour le gène *hgp1*, sont restreintes à la région non-codante du gène et n'affectent ni sa transcription ni sa traduction. Le gène *hgp2* de la souche 129Sv/J ne fut pas analysé de façon aussi détaillée que le gène *hgp1*; la séquence de son ADNc révéla toutefois des mutations dans sa région codante que modifient la nature de deux acides aminés du domaine N-terminal de cette protéine, si elle est exprimée. Un anticorps reconnaissant spécifiquement Bgp2 n'étant pas disponible, il fut impossible de tenter d'évaluer l'expression de cette protéine chez les souris de souche 129Sv/J. Il semble donc que le gène *hgp2* des souris de souche 129Sv/J est différent du gène *hgp2* des souris BALB/c.

Cette caractérisation du gène *hgp1* chez les souris de souche 129Sv/J a démontré qu'il était possible de réaliser l'ablation génique de ce gène chez ces souris. Il serait en effet vain de faire l'ablation d'un gène qui ne serait exprimé. Comme il existe des variations génétiques entre les souris de différentes souches, ces vérifications étaient importantes. Les résultats de ces analyses nous ont toutefois convaincus qu'il était nécessaire d'obtenir le gène *hgp1* de la souche 129Sv/J pour la suite des expériences, car celui-ci montrait des différences avec le gène *hgp1* de souche BALB/c, déjà cloné par notre équipe.

## **Criblage de la Banque Génomique**

La première banque génomique de phage fut criblée à deux reprises. Elle fut criblée avec les sondes NcoI et ADNc. L'analyse des clones ainsi obtenus ne permit pas d'identifier un bon gène *hgp1*. Cet échec pouvait avoir deux causes: la qualité de la banque, ou le processus de criblage qui, faute d'être assez sélectif, rendait difficile l'analyse détaillée d'un trop grand nombre de clones.

Nous avons donc criblé une autre banque génomique, avec cette fois-ci trois sondes: NcoI, ADNc et TaqI (Figure 1B). Comme NcoI et TaqI hybrident aux extrémités 5' et 3' de la portion de *hgp1* que nous désirions isoler, nous augmentions ainsi les chances d'obtenir un clone contenant toute cette région. De plus, l'utilisation de trois sondes au lieu de deux nous permettrait peut-être d'obtenir un plus petit nombre de clones triplement positifs qui comprendraient moins de faux positifs.

Cette stratégie nous permit d'isoler cinq clones triplement positifs dont deux contenaient la région de *hgp1* que nous recherchions. La décision d'utiliser une troisième sonde fut donc fructueuse: en effet, sans l'information supplémentaire fournie par cette sonde, nous aurions dû purifier et analyser les dix-sept clones doublement positifs avec les sondes NcoI et ADNc (Tableau 1, parenthèse A) afin d'obtenir ces mêmes deux clones.

## **Génération des Cellules de Souche Embryonnaire *hgp1 +/-***

Aucun des 1221 clones de cellules de souche embryonnaire que nous avons isolés ne contenait la mutation désirée. Ce résultat indique que le vecteur que nous avons conçu pour introduire la mutation dans ces cellules a une efficacité de moins de 1/1000

avec une simple sélection positive et de moins de 1/150 avec une double sélection positive-négative (Tableau 2).

Les facteurs déterminant la fréquence à laquelle un gène donné peut être ciblé par un vecteur de ciblage sont encore mal connus. Certains des facteurs pouvant potentiellement affecter cette fréquence sont la longueur du fragment d'ADN du vecteur parfaitement homologue au gène ciblé, la position du gène de sélection positive dans ce gène et le site de linéarisation du vecteur [34, 35]. La stratégie de ciblage utilisant les sélections positive et négative permet d'isoler des clones démontrant des taux de recombinaison homologue allant de 1/10 à 1/1000, selon le gène étudié [34].

Notre cas n'est donc pas exceptionnel. Il est possible que le locus du gène *bgp1* soit moins accessible aux événements de recombinaison homologue que la moyenne. Il est également possible que l'asymétrie de notre vecteur de ciblage, qui comporte 1,2 kb d'homologie d'un côté du gène *neo<sup>r</sup>* et 6,0 kb d'homologie de l'autre, soit défavorable à un événement de recombinaison homologue. Par ailleurs, les vecteurs de ciblage qui entraînent la délétion d'une portion d'un gène sont de 5 à 12 fois moins efficaces que ceux qui n'entraînent que l'insertion de la cassette *neo<sup>r</sup>* dans le gène sans délétion [35]. Notre décision de tenter d'enlever l'exon N-terminal du gène *bgp1* a donc peut-être réduit considérablement l'efficacité de nos vecteurs de ciblage.

Les résultats des électroporations déjà effectuées démontrent que les vecteurs de ciblage conçus sont peu efficaces. La prochaine étape de ce projet consisterait donc à construire un nouveau vecteur de ciblage. Celui-ci devrait être plus symétrique, i.e. que les régions d'homologie au gène *bgp1* flanquant le gène *neo<sup>r</sup>* devraient être de longueur à

peu près égale. De plus, il serait préférable que la cassette *neo'* soit simplement insérée dans la séquence du gène *bgp1*, au lieu d'y remplacer un exon. Enfin, la double sélection positive et négative s'est révélée très utile pour réduire le nombre total de clones à analyser en réduisant considérablement le nombre de faux positifs. Il serait donc approprié de conserver cette stratégie pour le nouveau vecteur de ciblage, et de placer le gène de sélection négative (thymidine kinase) à une des extrémités de cette nouvelle construction ou même aux deux extrémités, si c'est possible. Un membre de l'équipe de Nicole Beauchemin continue ce projet et ces modifications seront appliquées au nouveau vecteur de ciblage.

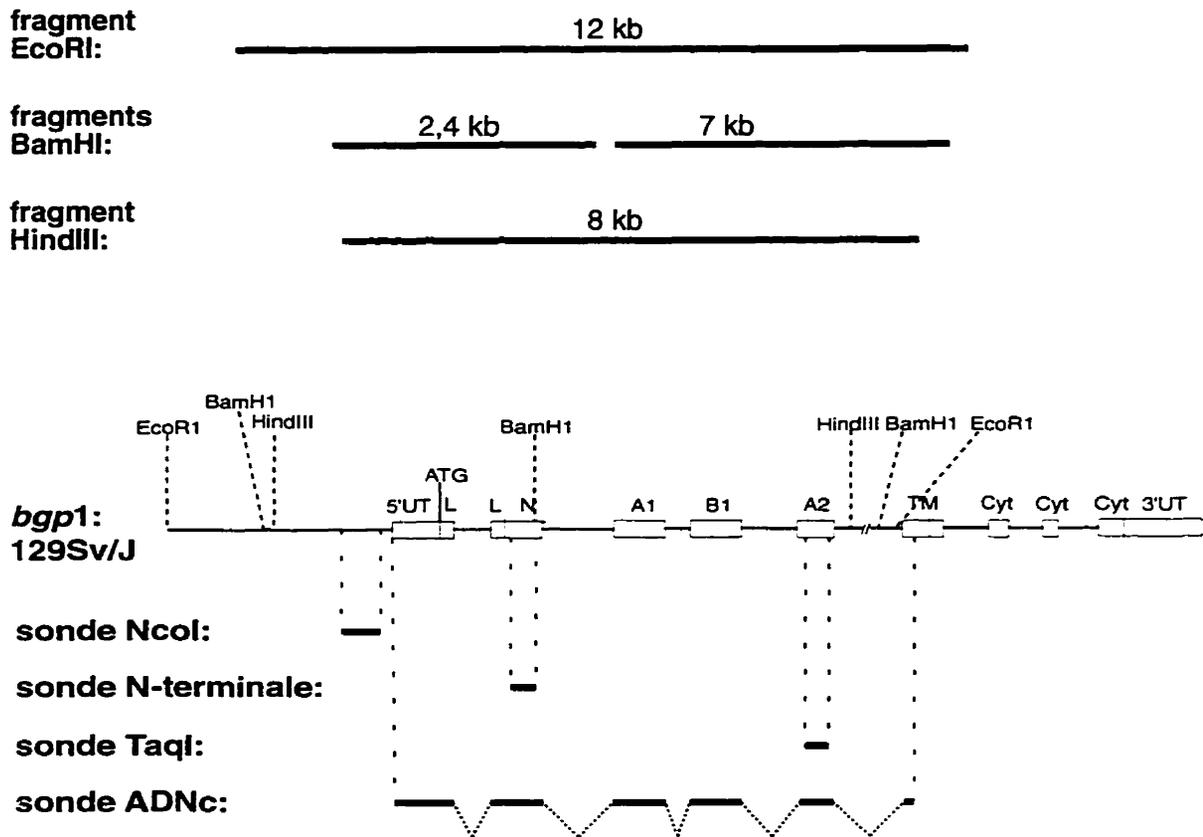
Les ablations géniques sont des expériences délicates. Ces expériences requièrent énormément de temps et il est impossible de savoir à l'avance si tous ces efforts seront récompensés. Les résultats peuvent cependant être très intéressants. Dans le cas de l'ablation génique de *bgp1*, le mode d'expression de cette protéine est si étendu et varié qu'il suggère fortement que les souris *bgp1* *-/-* montreront un phénotype dû à l'absence de cette glycoprotéine. Ce point est discuté en détails dans le chapitre 4 de ce mémoire. La poursuite de ces expériences, même si elle est longue et ardue, permettra certainement de clarifier la fonction physiologique de Bgpl.

sonde(s) ayant hybridé avec les clones	NcoI, ADNc et TaqI	NcoI et ADNc seulement	NcoI et TaqI seulement	NcoI seulement	ADNc et TaqI seulement	ADNc seulement	TaqI seulement
nombre de clones	5 *	12	0	11	12	10	31

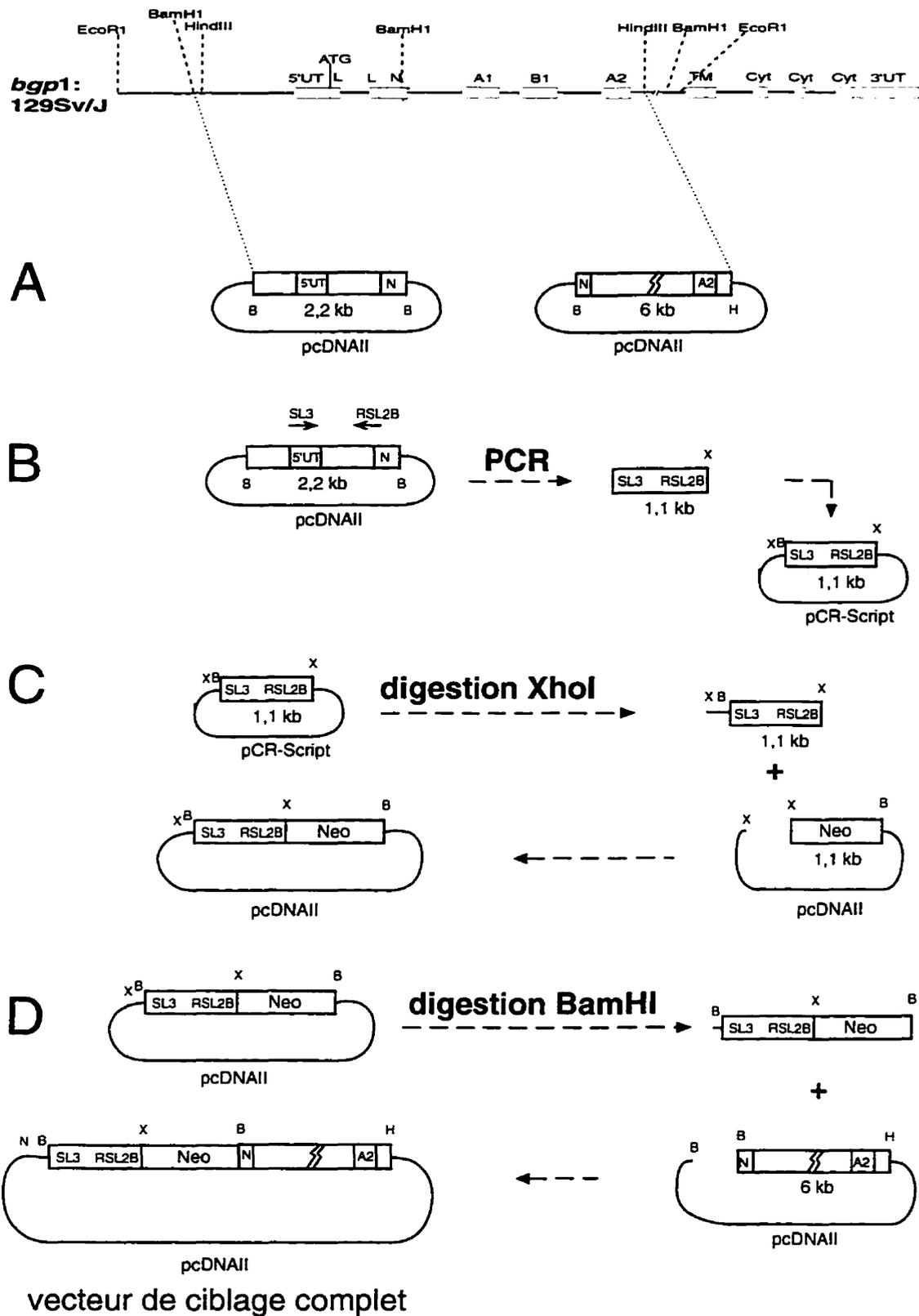
**Tableau 1. Résultats du criblage de la deuxième banque de phage avec les sondes NcoI, ADNc et TaqI.** La deuxième banque génomique fut criblée à l'aide des sondes NcoI, ADNc et TaqI (Figure 1B). Parmi les cinq clones triplement positifs identifiés (\*) et analysés, deux comprenaient la région du gène *hgp1* que nous recherchions.

	lignée de cellules ES	nombre de cellules transfectées	vecteur utilisé	nombre de clones isolés	nombre de clones positifs
1	J1	$1 \times 10^7$	simple sélection	159	0
2	RW4	$1 \times 10^7$	simple sélection	372	0
3	RW4	$2 \times 10^7$	simple sélection	532	0
4	RW4	$1 \times 10^7$	double sélection	60	0
5	J1	$1 \times 10^7$	double sélection	98	0
totaux		$6 \times 10^7$		1221	0

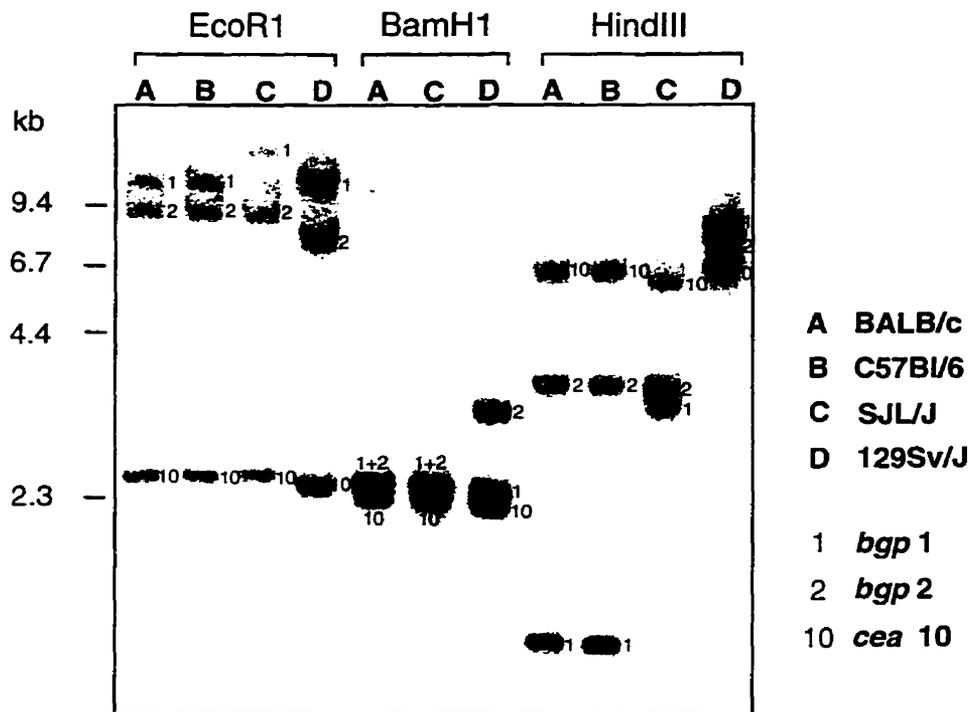
**Tableau 2. Résultats des électroporations de cellules de souche embryonnaire.** Les cellules de souche embryonnaire de lignée J1 ou RW4 furent transfectées par électroporation avec le vecteur de ciblage comprenant un gène de sélection positive (*neo<sup>r</sup>*) (simple sélection) ou le vecteur de ciblage comprenant à la fois un gène de sélection positive et un gène de sélection négative (*neo<sup>r</sup>* et TK) (double sélection) (Figure 7). Les clones résistants au(x) processus de sélection furent isolés et analysés par Southern pour détecter un événement de recombinaison homologue.



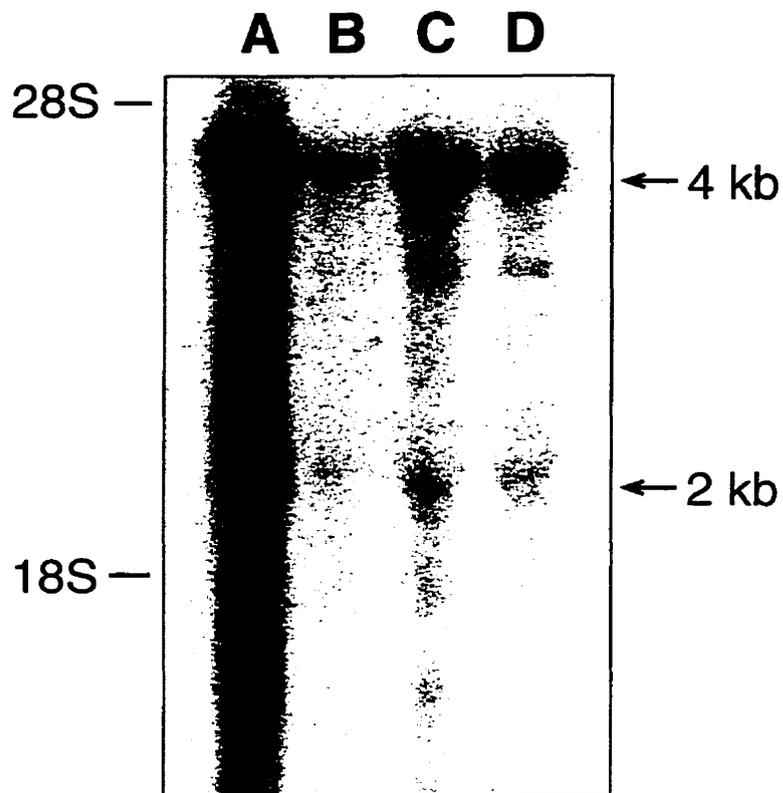
**Figure 1. Description des Sondes** **A.** Longueur et position des fragments générés par les digestions EcoRI, BamHI et HindIII. **B.** Description des sondes utilisées. La sonde **NcoI** est un fragment de 391 pb provenant de la digestion du gène *bgp1* par l'enzyme *NcoI*. Elle reconnaît le promoteur des trois gènes *bgp*, i.e. *bgp1*, *bgp2* et *cea10*. La sonde **N-terminale** est un fragment de 102 pb provenant d'une réaction de polymérisation en chaîne avec les amorces PN8 et RPN9. Elle reconnaît spécifiquement le domaine N-terminal du gène *bgp1*. La sonde **TaqI** est un fragment de 150 pb provenant de la digestion de l'ADNc de *bgp1* avec l'enzyme *TaqI*. La sonde **ADNc** est un fragment de 1360 pb provenant de la digestion de l'ADNc de *bgp1* avec les enzyme *EcoRI* et *StuI*.



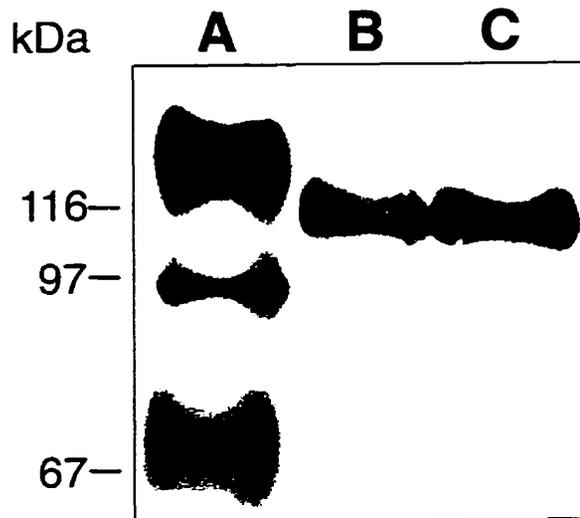
**Figure 2. Construction du Vecteur de Ciblage** à partir d'un fragment du gène *bgp1* de souche 129Sv/J. La procédure est décrite en détails dans la section "Construction du vecteur de ciblage des Matériels et Méthodes". Abréviations: B: site de restriction BamHI, X: site de restriction XhoI, H: site de restriction HindIII.



**Figure 3. Mode de Restriction des Gènes *bgp* chez quatre lignées pures de souris.** La sonde utilisée, *NcoI* (Figure 1B), reconnaît une région du promoteur que les gènes *bgp1*, *bgp2* et *cea10* ont en commun. L'identité des fragments fut déterminée par l'usage de sondes spécifiques aux domaines N-terminaux des gènes *bgp1* et *bgp2*. L'endonucléase de restriction *HindIII* met en évidence une différence entre les gènes *bgp1* des souches BALB/c et 129Sv/J. Les fragments *bgp2* de la souche 129Sv/J sont différents de ceux de la souche BALB/c pour les trois endonucléases utilisées.

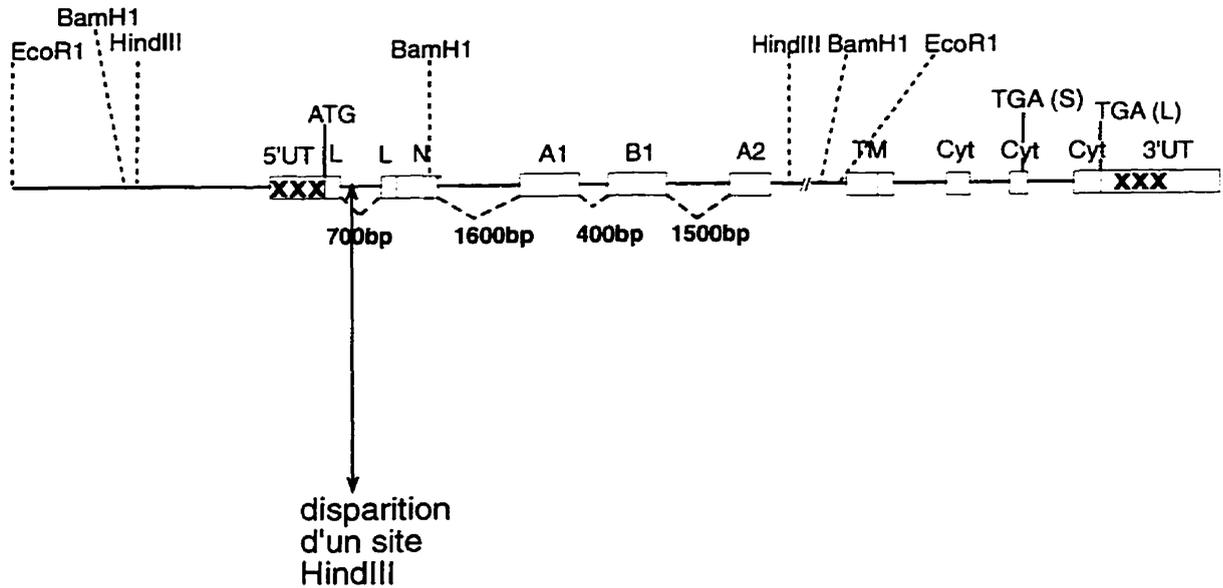


**Figure 4. Expression de l'ARNm de *bgp1*** Analyse Northern. Les pistes correspondent à: A: ARN total de côlon de souris BALB/c, B: ARN total de foie de souris BALB/c, C: ARN total de foie d'une souris provenant du croisement d'une souris BALB/c et d'une souris 129Sv/J, D: ARN total de foie de souris 129Sv/J. L'ARN de souris BALB/c sert de contrôle positif. Les ARNm de *bgp1* ont été détectés avec la sonde ADNc (Figure 1B). Les ARNm de 4 kb et de 2 kb de *bgp1* sont présents en quantités comparables dans les foies des souris BALB/c et 129Sv/J.

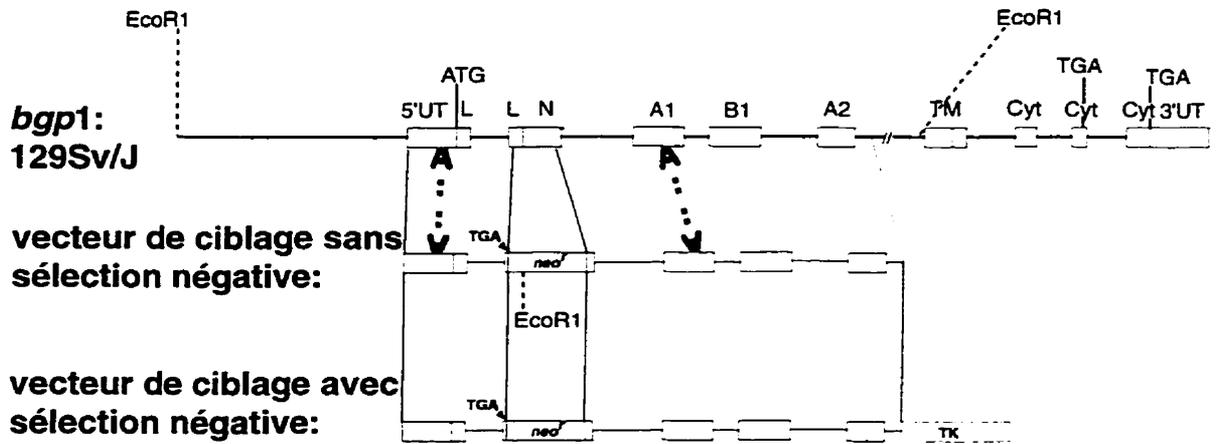


**Figure 5. Expression de la protéine Bgp1 chez les souris 129 Sv/J** Les pistes correspondent à: A: fraction membranaire de protéines de côlon de souris 129Sv/J, B: fraction membranaire de protéines de foie de souris 129Sv/J, C: fraction membranaire de protéines de foie d'une souris provenant du croisement d'une souris BALB/c et d'une souris 129Sv/J. Les protéines ont été détectées avec l'anticorps monoclonal CC1. Bgp1 est donc exprimée chez les souris 129 Sv/J.

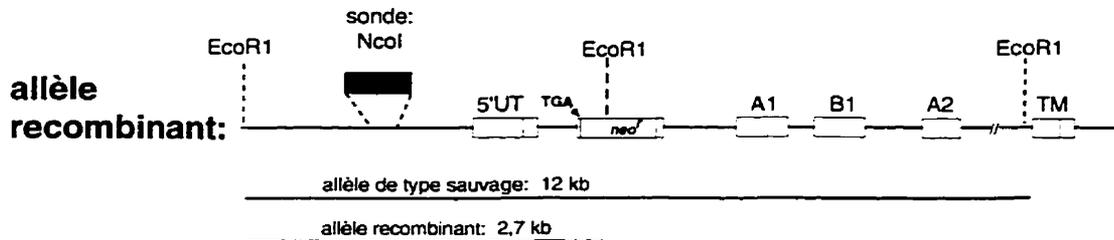
## *bgp1* 129Sv/J



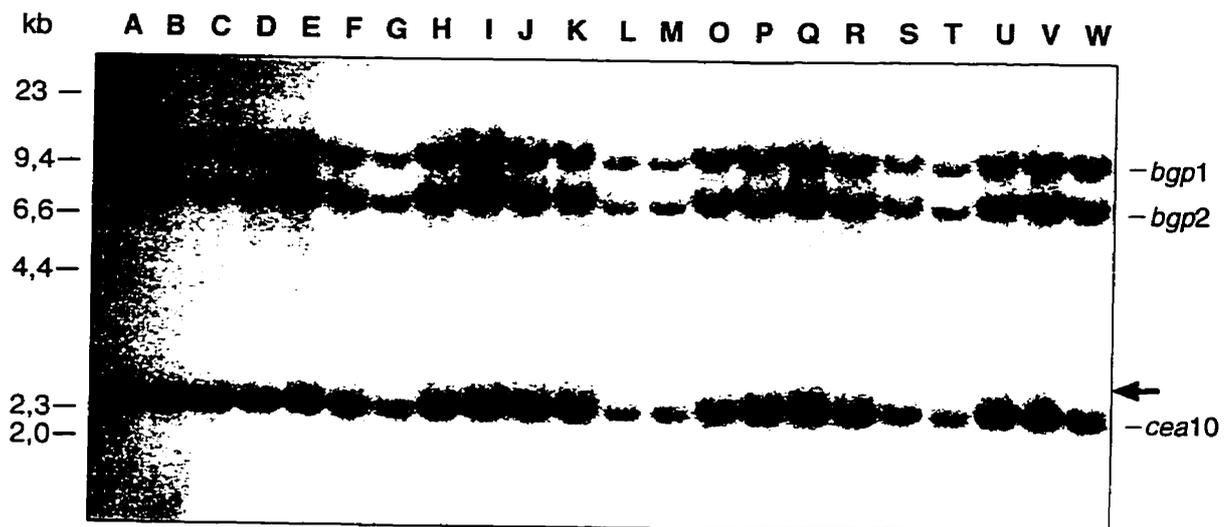
**Figure 6.** *bgp1* chez les Souris 129Sv/J Analyses comparées des gènes *bgp1* des souches 129Sv/J et BALB/c. Les introns étudiés sont de même longueur dans les deux souches; ces longueurs sont indiquées sur l'illustration. Les différences découvertes comprennent la disparition d'un site de reconnaissance de l'endonucléase de restriction HindIII dans le premier intron du gène de la souche 129Sv/J et quelques mutations dans la séquence des régions 5'UT et 3'UT du gène (indiquées par des X).



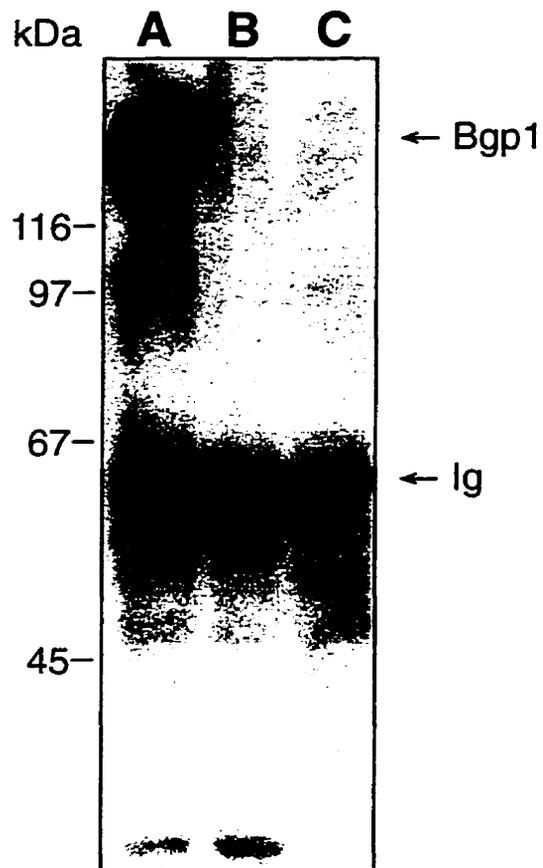
← . . . . → : recombinaison homologue



**Figure 7. Stratégie de Ciblage** Les deux vecteurs utilisés, comprenant soit uniquement un gène de sélection positive (*neo<sup>r</sup>*), soit deux gènes permettant une double sélection positive-négative (*neo<sup>r</sup>* et TK) sont illustrés. Il est à remarquer que la recombinaison homologue avec le vecteur de ciblage contenant le gène de sélection homologue exclut ce dernier de l'allèle recombinant. Après recombinaison homologue avec un des vecteur de ciblage, l'allèle recombinant contient un nouveau site EcoRI, compris dans le gène *neo<sup>r</sup>*, qui permet de différencier les allèles de *bgp1* sauvage et recombinant par analyse Southern.



**Figure 8. Analyse des Recombinants** Exemple d'un résultat d'analyse Southern des clones de souche embryonnaire isolés lors de l'expérience no. 2 (Tableau 2.) L'ADN des clones fut soumis à une digestion par l'endonucléase de restriction EcoRI. Les fragments furent détectés avec la sonde NcoI (Figure 1B). On reconnaît les fragments typiques des gènes *bgp* des souris de souche 129Sv/J. Dans le cas où un clone aurait subi une recombinaison homologe avec le vecteur de ciblage, un fragment supplémentaire de 2,7 kb (indiqué par la flèche) serait apparent.



**Figure 9. Expression de Bgp1 dans les cellules de souche embryonnaire** Les pistes correspondent à: A: contrôle positif, protéines totales de cellules NIH 3T3 transfectées avec Bgp1D, soumises à une immunoprécipitation avec l'anticorps polyclonal 231, B: protéines totales de cellules de souche embryonnaire J1, soumises à une immunoprécipitation de la même façon (ces cellules devant être cultivées sur des cellules nourricières (i.e. des fibroblastes embryonnaires), des protéines de cellules nourricières se retrouvent aussi dans l'échantillon), C: contrôle négatif, protéines totales de cellules nourricières, soumises à une immunoprécipitation avec le même anticorps. La détection

## RÉFÉRENCES

- [1] Beauchemin N, Lin SH. (sous presse). Role of C-CAM as a tumour suppressor. "Cell Adhesion and Communication", C.P. Stanners (ed.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, chap. 9.
- [2] Nédellec P, Turbide C, Beauchemin N. Characterization and transcriptional activity of the mouse biliary glycoprotein I gene, a carcinoembryonic antigen-related gene. *Eur J Biochem* 1995; 231: 104-14.
- [3] Nédellec P, Dveksler GS, Daniels E, Turbide C, Chow B, Basile AA, Holmes KV, Beauchemin N. *Bgp2*, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J Virol* 1994; 68: 4525-37.
- [4] Frängsmyr E, Baranov V, Prall F, Yeung M M-W, Wagener C, Hammarström S. Cell- and region-specific expression of biliary glycoprotein and its messenger RNA in normal human colonic mucosa. *Cancer Res* 1995; 55: 2963-67.
- [5] Svalander PC, Odin P, Nilsson BO, Öbrink B. Expression of cell CAM-105 in the apical surface of rat uterine epithelium is controlled by ovarian steroid hormones. *J Reprod Fertil* 1990; 88: 213-21.
- [6] Hsieh J-T, Lin S-H. Androgen regulation of cell adhesion molecule gene expression in rat prostate during organ degeneration. *J Biol Chem* 1994; 269: 3711-16.
- [7] Hansson M, Blilstad I, Öbrink B. Cell-surface localization and molecular properties of cell-CAM 105 in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 1989; 181: 63-74.

- [8] Ocklind C, Öbrink B. Intercellular adhesion of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1982; 257: 6788-95.
- [9] Odin P, Asplund M, Busch C, Öbrink B. Immunohistochemical localization of Cell-CAM105 in rat tissues: Appearance in epithelia, platelets, and granulocytes. *J Histochem Cytochem* 1988; 36: 729-39.
- [10] Rosenberg M, Nédellec P, Jothy S, Fleischer D, Turbide C, Beauchemin N. The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is down-regulated in malignant mouse tissues. *Cancer Res* 1993; 53: 4938-45.
- [11] Neumaier M, Paululat S, Chan A, Matthaes P, Wagener C. Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10744-48.
- [12] Kleinerman DI, Troncoso P, Lin S-H, Pisters LL, Sherwood ER, Brooks T, von Eschenbach AC, Hsieh J-T. Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: Implication as a tumor suppressor. *Cancer Res* 1995; 55: 1215-20.
- [13] Daniels E, Létourneau S, Turbide C, Kuprina N, Rudinskaya T, Yazova AC, Holmes KV, Dveksler GS, Beauchemin N. Biliary glycoprotein 1 expression during embryogenesis: Correlation with events of epithelial differentiation, mesenchymal-epithelial interactions, absorption and myogenesis. *Dev Dynamics* 1996; 206: 272-90.
- [14] Aurivillius M, Hansen OC, Lazrek MBS, Bock E, Öbrink B. The cell adhesion molecule Cell-CAM 105 is an ecto-ATPase and a member of the immunoglobulin superfamily. *FEBS Lett* 1990; 264: 267-69.

- [15] Rojas M, Fuks A, Stanners CP. Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin supergene family, functions *in vitro* as a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent intercellular adhesion molecule. *Cell Growth Differ* 1990; 1: 527-33.
- [16] Turbide C, Rojas MS, Stanners CP, Beauchemin N. A mouse carcinoembryonic antigen gene family member is a calcium-dependent cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 1991; 266: 309-15.
- [17] McCuaig K, Turbide C, Beauchemin N. mmCGM1a: a mouse carcinoembryonic antigen gene family member, generated by alternative splicing, functions as an adhesion molecule. *Cell Growth Differ* 1992; 3: 165-74.
- [18] Oikawa S, Kuroki M, Matsuoka Y, Kosaki G, Nakazato H. Homotypic and heterotypic  $\text{Ca}^{2+}$ -independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 881-87.
- [19] Cheung PH, Luo W, Qiu Y, Zhang X, Earley K, Millirons P, Lin S-H. Structure and function of C-CAM1. The first immunoglobulin domain is required for intercellular adhesion. *J Biol Chem* 1993; 268: 24303-10.
- [20] Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science* 1994; 266: 1508-18.
- [21] Kunath T, Ordonez C, Turbide C, Beauchemin N. Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene* 1995; 11: 2375-82.
- [22] Hsieh JT, Luo W, Song W, Wang Y, Kleinerman DI, Van NT, Lin S-H. Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) in

prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches. *Cancer Res* 1995; 55: 190-97.

[23] Sippel CJ, Fallon RJ, Perlmutter D. Bile acid efflux mediated by the rat liver canalicular bile acid transport/Ecto-ATPase protein requires serine 503 phosphorylation and is regulated by tyrosine 488 phosphorylation. *J Biol Chem* 1994; 269: 19539-45.

[24] Beauchemin N, Kunath T, Robitaille J, Chow B, Turbide C, Daniels E, Veillette A. Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene* sous presse, 1997.

[25] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989; 244: 1288-92.

[26] Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 1988; 336: 348-52.

[27] Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragment for high specific activity. *Analytical Biochemistry* 1984; 137: 266-67.

[28] Dveksler GS, Pensiero MN, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, Basile AA, Elias PE, Holmes KV. Mouse coronavirus MHV-A59 and blocking anti-receptor monoclonal antibody bind to the N-terminal domain of cellular receptor MHVR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1716-20.

[29] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

- [30] Robertson EJ. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach. IRL Press. 1987.
- [31] Riele HT, Maandag ER, Berns A. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5128-32.
- [32] Dveksler GS, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, McCuaig K, Pensiero MN, Jiang GS, Beauchemin N, Holmes KV. Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J Virol* 1993; 67: 1-8.
- [33] McCuaig K, Rosenberg M, Nédellec P, Turbide C, Beauchemin N. Expression of the *bgp* gene and characterization of mouse biliary glycoprotein isoforms. *Gene* 1993; 127: 173-83.
- [34] Hasty P, Riviera-Perez J, Bradley A. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 5586.
- [35] Hasty P, Riviera-Perez J, Chang C, Bradley A. Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4509.

## CHAPITRE 4: DISCUSSION

## INTRODUCTION

Le projet décrit dans ce mémoire visait à générer des souris mutantes *bgpl* *-/-* afin de mieux définir le rôle physiologique du produit de ce gène. Des expériences préliminaires ayant pour but de déterminer le mode d'expression de *Bgpl* durant le développement embryonnaire sont décrites au chapitre 2. Ces données s'avèrent très utiles à l'élaboration d'une stratégie pour analyser le phénotype des souris mutantes lorsque celles-ci seront disponibles. La génération des souris *bgpl* *-/-* est décrite au chapitre 3 de ce mémoire. Le présent chapitre discutera de la suite éventuelle de ce projet, soit l'étude du (des) phénotype(s) que présenteront les souris mutantes.

À la lumière des résultats d'ablations géniques déjà publiées dans la littérature, on constate que ce type d'expérience entraîne trois grandes catégories de phénotypes chez les souris mutantes. L'inactivation d'un gène peut être létale, i.e. entraîner la mort des souris avant leur naissance. Les souris homozygotes peuvent également être viables mais présenter d'importantes malformations, entraînant ou non une mort prématurée. Les souris mutantes peuvent enfin ne présenter que des anomalies subtiles que seules des analyses plus poussées mettront en évidence. Les études des modes d'expression de *Bgpl* durant la vie embryonnaire et durant la vie adulte de même que les connaissances déjà acquises sur les fonctions de *Bgpl* permettent de faire plusieurs hypothèses sur le

phénotype des souris *hgp1 -/-* pour chacune des situations décrites ci-haut et de prévoir des expériences pour aborder l'étude de ces souris lorsqu'elles seront disponibles.

### PHÉNOTYPE LÉTAL

Il est possible que l'ablation de *hgp1* du génome de la souris entraîne un phénotype létal. Dans ce cas, les portées provenant du croisement des souris hétérozygotes (*hgp1 +/-*) ne comprendront pas les 25% de souris *hgp1 -/-* que l'on s'attend à y trouver. Pour déterminer la cause de la mortalité *in utero* des souris homozygotes, des embryons devront être prélevés à différents stades de la gestation et être soumis à des analyses de génotype afin de déterminer à quelle étape de leur développement les embryons homozygotes meurent. S'il est impossible de trouver des embryons *hgp1 -/-*, nous devons en déduire que ceux-ci ne peuvent s'implanter. Ensuite, des analyses histologiques des embryons *hgp1 -/-* avant leur dégénérescence, si ceux-ci se sont implantés, pourraient permettre de déterminer la cause de la létalité.

Plusieurs types d'événements peuvent entraîner la mort intrautérine. La formation de la blastula, son implantation, la formation du sac vitellin et de la circulation vitelline, le développement du placenta, l'érythropoïèse et le développement de la circulation sanguine foetale sont des processus essentiels à la survie de l'embryon durant sa croissance. S'ils sont entravés par l'ablation d'un gène, il est fort probable que l'embryon mutant mourra avant le terme de la gestation. Par contre, des anomalies morphologiques, même sévères, peuvent très bien ne pas empêcher la survie de

l'embryon jusqu'à sa naissance si elles n'affectent pas un de ces processus [1]. D'après son mode d'expression, Bgp1 pourrait jouer un rôle dans les processus suivants: la formation de la blastula et son implantation, et le développement du sac vitellin et du placenta.

### **Implantation**

L'expression de Bgp1 dans l'embryon avant son implantation a été étudiée chez le rat [2]. Bgp1 n'est pas exprimée par les cellules de la morula. Cette protéine est par contre exprimée sur toute la surface de la blastula, avant son implantation. Les cellules composant la surface de la blastula sont des trophoblastes. Au moment de l'implantation, Bgp1 disparaît des trophoblastes muraux, i.e. la portion de la blastula qui est la première à pénétrer l'endomètre. Nous avons étudié l'expression de Bgp1 dans des embryons de souris après l'implantation (6,5, 7,5, et 8,5 *dpc*) et nous n'avons pu détecter la réapparition de Bgp1 dans les trophoblastes avant 10,5 *dpc* [3].

L'implantation survient à 4,5 *dpc* chez la souris. Les trophoblastes, i.e. les cellules formant l'extérieur de la blastula, doivent littéralement pénétrer l'endomètre de l'utérus, un événement qui rappelle le comportement invasif d'une cellule tumorale métastatique. Pour ce faire, les trophoblastes sécrètent des protéases (par exemple la gélatinase B, l'activateur de plasminogène de type urokinase (uPA), la stromélysine, la collagénase de type IV) et modifient leurs caractéristiques d'adhérence, par exemple en sécrétant la ténascine, une protéine "anti-adhésive" ou en modulant les intégrines exprimées à leur surface [1, 4]. Chez la souris, le potentiel d'invasion des trophoblastes, ainsi que leur production de gélatinase B, atteint son sommet à 7,5 *dpc*. L'invasion des

trophoblastes doit ensuite être contrôlée et ultimement arrêtée pour une poursuite normale de la gestation. Des facteurs produits par la caduque de l'utérus ou les trophoblastes, comme TGF- $\beta$ 1, la macroglobuline  $\alpha$ 2 et les inhibiteurs de métalloprotéases tissulaires (TIMPs) contribuent au contrôle de l'invasion des trophoblastes. De plus, les trophoblastes modulent l'expression des intégrines à leur surface de façon à inhiber leur potentiel d'invasion [1]. En considérant toutes ces informations, on remarque une coïncidence intéressante: Bgp1 disparaît des trophoblastes de la blastula au moment de l'implantation, quand ceux-ci deviennent invasifs, et réapparaît vers 10,5 *dpc* dans les trophoblastes, lorsque ceux-ci ont cessé d'être invasifs [3]. Il est donc possible que l'absence de Bgp1 entraîne un déséquilibre dans le processus d'invasion des trophoblastes dans l'endomètre de l'utérus, entraînant un échec de l'implantation ou une résorption du conceptus très tôt après l'implantation.

Ce résultat indiquerait que Bgp1 est important pour la fonction des trophoblastes, mais fournirait peu d'information sur le rôle que cette protéine joue dans les tissus apparaissant plus tard dans le développement. Pour tester plus avant la fonction de Bgp1, les expériences suivantes pourraient être tentées.

L'absence d'implantation ou une dégénérescence du conceptus très tôt après l'implantation peuvent avoir pour cause un défaut intrinsèque de la blastula mutante. Bgp1 étant présente dans les trophoblastes de la blastula avant l'implantation, il est possible qu'elle soit essentielle à la formation d'une blastula normale. Il serait possible de prélever les blastulas qui provenant du croisement de souris *bgp1 +/-* à 3,5 *dpc*, i.e. avant leur implantation, et de les cultiver *in vitro*. La présence ou l'absence d'une

proportion normale (25%) de blastulas *bgp1* *-/-* nous informerait alors sur l'importance de *Bgp1* pour la formation des blastulas. De plus, après quelques jours de culture, la croissance des cellules du trophoctoderme (i.e. les trophoblastes) et des cellules de la masse cellulaire interne des blastulas mutantes pourrait être analysée et donner des informations sur le rôle de *Bgp1* dans la prolifération de ces lignées cellulaires [5, 6]. Des expériences similaires sont possibles avec les morulas, prélevées à 2,5 *dpc*. Elles permettraient de vérifier l'influence de l'absence de *Bgp1* sur la formation de la blastula et la différenciation des trophoblastes s'il s'avérait que les cellules de la blastula sont anormales [5, 6]. Ces expériences furent tentées avec succès par un groupe de recherche qui fit l'ablation génique de *Fgf4* [6]. Le produit de ce gène est un facteur de croissance des fibroblastes. Les conceptus *Fgf4* *-/-* dégénèrent très tôt après l'implantation (6,5 *dpc*). La culture de blastula *Fgf4* *-/-* *in vitro* permet de déterminer que le problème se situe au niveau de la prolifération des cellules de la masse cellulaire interne.

Un autre type d'expérience possible serait la génération de cellules de souche embryonnaire homozygotes *bgp1* *-/-*. Pour les générer il suffit de cultiver les cellules de souche embryonnaire hétérozygotes dans une concentration plus élevée de l'agent de sélection (i.e. de G418 dans notre cas) [7]. Les clones qui survivront à cette sélection seront ceux qui auront dupliqué le gène *neo<sup>r</sup>*. Un des mécanismes de duplication possibles est le remplacement de l'allèle sauvage de *bgp1* par l'allèle mutant, comprenant le gène *neo<sup>r</sup>* [7]. Ces cellules *bgp1* *-/-* peuvent ensuite être cultivées dans des conditions favorisant la formation de "corps embryoïdes" qui, à leur tour, peuvent être placés dans des conditions entraînant leur différenciation en plusieurs types de

cellules dérivées des trois feuillets embryonnaires (endoblaste, mésoblaste et ectoblaste) [8]. On peut par exemple retrouver dans ces corps embryoïdes des cellules nerveuses, des cellules épithéliales formant des tubules ou du cartilage. En comparant les aspects histologiques, histoimmunochimiques ou morphologiques des corps embryoïdes différenciés formés par les cellules de souche embryonnaire *bgp1* *-/-* et *bgp* *+/-*, il serait peut-être possible de déterminer si l'absence de Bgp1 affecte l'apparition d'un type de lignée cellulaire.

Le potentiel de différenciation des cellules de souche embryonnaire *bgp1* *-/-* peut également être testé par leur injection dans des souris syngéniques. Ces injections entraînent l'apparition de tératomes chez ces souris après quelques semaines [5]. Ces tumeurs contiennent une grande variété de types de cellules et de tissus, issus de la différenciation des cellules de souche embryonnaire injectées. Encore une fois, la comparaison entre les tératomes issus des cellules *bgp1* *-/-* et *bgp1* *+/-* pourrait permettre de découvrir l'effet de l'absence de Bgp1 sur la différenciation d'un type de cellule.

Il est également possible d'utiliser ces cellules de souche embryonnaire *bgp1* *-/-* pour des microinjections dans des blastulas de type sauvage, dans le but de produire des souris chimériques [5, 9]. En effet, il existe plusieurs exemples de défauts génétiques qui sont létaux lorsqu'ils affectent toutes les cellules d'un organisme mais qui ne le sont pas dans des chimères comme par exemple la trisomie 15 [10] et la trisomie 17 [11]. Les embryons formés en partie de cellules *bgp1* *-/-* pourraient de cette façon survivre plus longtemps que les embryons entièrement formés de cellules *bgp1* *-/-*, peut-être même jusqu'à terme. La participation des cellules mutantes à chaque tissu de l'embryon ou de

la souris chimérique serait alors évaluée par immunohistochimie. L'analyse des portions de tissu provenant des cellules *hgp1* *-/-* donnerait des informations sur la fonction physiologique de *Bgp1* dans ceux-ci. Cette expérience pourrait donc permettre d'évaluer l'influence de *Bgp1* sur des événements ultérieurs à la mort des conceptus mutants.

### **Membranes Extra-Embryonnaires**

*Bgp1* est exprimée dans plusieurs des structures et membranes extra-embryonnaires qui apportent un soutien indispensable à l'embryon durant sa croissance. En effet, elle est présente à la surface des cellules de l'endoderme viscéral du sac vitellin. Avant l'établissement d'un placenta fonctionnel, vers 9,5 *dpc*, l'échange des nutriments et des gaz sanguins entre la mère et l'embryon se fait à travers cette membrane. Le placenta est une autre des structures essentielles à la survie de l'embryon que l'absence de *Bgp1* pourrait affecter. En effet, dès 10,5 *dpc*, les trophoblastes géants et les spongiotrophoblastes du placenta expriment *Bgp1* [3].

Les trophoblastes sont des cellules très importantes pour la survie de l'embryon. Ce sont des cellules épithéliales spécialisées qui forment la jonction physique entre l'embryon et l'utérus. Les trophoblastes influencent le système endocrinien maternel de façon à ce que celui-ci maintienne un milieu hormonal compatible avec la poursuite de la gestation. Les trophoblastes expriment des antigènes paternels, sont accessibles au système immunitaire maternel, mais réussissent à éviter d'être rejeté par celui-ci. Ils participent à l'établissement d'une vasculature hybride où ils agissent comme des cellules endothéliales, aidant au transport des nutriments et des gaz sanguins entre la mère et l'embryon [1].

Si l'absence de Bgp1 causait un mal fonctionnement du sac vitellin ou du placenta mortel pour l'embryon, des analyses histologiques de ces embryons seraient nécessaires pour étudier leurs anomalies. De plus, au moins deux expériences pourraient être tentées afin d'obtenir des informations supplémentaires sur la fonction de cette protéine.

En premier lieu, la production de souris chimériques avec des cellules de souche embryonnaire *bgp1*<sup>-/-</sup>, mentionnée plus haut, serait indiquée. Les tissus de ces souris, qui survivraient peut-être plus longtemps, seraient formés en partie de cellules *bgp1*<sup>-/-</sup>. Certains, comme le tube digestif, l'épiderme, les reins ou le foie, où Bgp1 est normalement exprimée, pourraient comporter des anomalies révélatrices du rôle de cette glycoprotéine.

En deuxième lieu, Bgp1 est exprimée dans plusieurs types de cellules du système immunitaire et pourrait affecter la différenciation, la prolifération ou la fonction normale de certaines de ces cellules. Si les souris *bgp1*<sup>-/-</sup> mouraient avant l'âge adulte, il serait difficile d'évaluer le rôle de Bgp1 dans le système immunitaire. Cependant l'expérience suivante permettrait de tester le système immunitaire des souris mutantes malgré un phénotype létal. Le foie est un site d'hématopoïèse majeur durant le développement embryonnaire. Il contient un grand nombre de cellules souches hématopoïétiques, et celles-ci peuvent reconstituer la population normale de cellules immunitaires chez des souris adultes n'en possédant plus. Des cellules de foie d'embryons *bgp1*<sup>-/-</sup> pourraient être injectées dans des souris adultes de type sauvage ayant reçu des doses létales de radiation. Le nouveau système immunitaire de ces souris, constitué de cellules *bgp1*<sup>-/-</sup>,

pourrait alors être évalué. Les expériences destinées à évaluer le système immunitaire seront discutées plus bas [12].

Les causes de létalité des souris *bgp1* *-/-* discutées jusqu'ici sont celles qui semblent les plus probables en se basant sur le mode d'expression de *Bgp1* durant le développement embryonnaire. Cette discussion ne prétend en aucun cas être exhaustive; il demeure possible que l'absence de *Bgp1* soit létale pour des raisons autres que celles évoquées ici.

Il faut par ailleurs souligner qu'il existe une certaine variabilité dans les résultats des expériences d'ablation génique. En effet, l'ablation du gène du récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGFR) a permis d'observer trois phénotypes différents, selon la souche de souris dans laquelle la mutation était introduite. Ces phénotypes variaient de la mort du conceptus peu après l'implantation à la survie des souriceaux jusqu'à trois semaines après leur naissance [13]. Il est donc important de tester une ablation génique dans plusieurs contextes génétiques en faisant les croisements appropriés avec des souris de plusieurs souches différentes.

De plus, la stratégie même de délétion, i.e. la conception du vecteur de ciblage, peut influencer le phénotype final de façon importante. L'ablation génique du gène *MRF4/herculin/myf-6* en fournit un bon exemple. Trois groupes de recherche ont réalisé l'ablation de ce gène chez la souris en utilisant trois vecteurs de ciblage conçus différemment. Les phénotypes obtenus varient de la létalité à la viabilité complète des souris *MRF4* *-/-*. Cette variabilité dépend probablement des effets différents des trois vecteurs de ciblage sur un gène adjacent, *myf-5* [14]. Il faut donc être extrêmement

prudent quand vient le temps d'interpréter les résultats d'une ablation génique. Dans notre cas, il sera important de se rappeler que le gène *hgp2* est adjacent au gène *hgp1* [43]. Il est possible que Bgp2 puisse compenser, au moins partiellement, l'absence de Bgp1. Le phénotype exprimé par les souris *hgp1* *-/-* pourrait alors être influencé l'effet de notre vecteur de ciblage sur le gène *hgp2*. Il sera donc important de vérifier l'expression de *hgp2* au niveau de son ARNm et de sa protéine (si un anticorps spécifique devient disponible) dans les organes exprimant normalement Bgp2 qui seront affectés par l'inactivation de *hgp1*. Si Bgp2 s'avère également absente de ces organes, il nous sera impossible de conclure que le phénotype est causé uniquement par l'absence de Bgp1.

### **MALFORMATIONS NON-LÉTALES**

Les souris *hgp1* *-/-* pourraient très bien être viables. Dans ce cas, étant donné l'étendue de l'expression de Bgp1 durant le développement embryonnaire et la vie adulte, ces souris pourraient présenter des malformations dues à un développement anormal. Elle pourraient aussi souffrir du mal fonctionnement d'un organe mature. Le mode d'expression de Bgp1 suggère que de telles anomalies pourraient se retrouver dans le tube digestif, le foie, les reins, l'épiderme, le muscle et le système immunitaire.

#### **Tractus Digestif**

Chez la souris, le développement de l'endoderme du tractus digestif est caractérisé par une vague de différenciation cranio-caudale entre 15,5 et 19,5 *dpc*. Au

cours de cette différenciation, l'endoderme, à l'origine pseudostratifié, devient un épithélium cylindrique simple [15].

Nous avons étudié en détail l'expression de Bgp1 dans le système digestif durant le développement embryonnaire par des analyses histoimmunochimiques. Durant le développement embryonnaire, deux formes de Bgp1, reconnues par des anticorps différents (AgB10 et 231), sont exprimées dans le tractus gastro-intestinal. Une première forme, reconnue par l'anticorps monoclonal AgB10, est exprimée dans tout le tube digestif à 10,5 *dpc*, mais n'est plus présente que dans l'épithélium du rectum à 15,5 *dpc*. L'autre, reconnue par l'anticorps polyclonal 231, n'apparaît qu'à 15,5 *dpc* dans le tube digestif et y persiste jusqu'à la naissance. On ne retrouve les deux formes de Bgp1 au même endroit et en même temps que dans l'épithélium du rectum [3].

À la naissance, les cryptes de l'épithélium intestinal ne sont pas encore formées. Celles-ci sont des invaginations de la surface de l'épithélium intestinal. À la base de chaque crypte se trouve une cellule souche, non encore différenciée, qui prolifère pour renouveler cet épithélium. Ces cryptes apparaissent pendant le premier mois de la vie des souriceaux. Le lait maternel, en particulier le colostrum, contient une grande quantité des facteurs de croissance EGF et TGF $\alpha$ , que l'on croit impliqués dans la maturation et la prolifération du tube digestif du nouveau-né [16].

Bgp1 est exprimée à la surface apicale des cellules épithéliales de la lumière de l'intestin. Par contre, dans les cryptes intestinales, cette glycoprotéine n'est exprimé que sur les cellules qui sont les plus près de la lumière de l'intestin, soit les cellules les plus différenciées. Les cellules des cryptes qui prolifèrent activement sont dépourvues de

Bgp1. Ces résultats furent obtenus par des analyses d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie en microscopie électronique chez l'humain [17]. La réalité est toutefois probablement plus complexe car des études histoimmunochimiques réalisées dans notre laboratoire avec un anticorps polyclonal reconnaissant le domaine cytoplasmique long de Bgp1 ont révélé la présence de cette protéine dans les cellules de la base des cryptes intestinales [18].

Il ressort de toutes ces observations que Bgp1 est présente dans l'épithélium du tube digestif durant toute sa période de maturation et qu'elle y reste exprimée dans les cellules différenciées de l'épithélium de l'intestin. Dans des conditions anormales, lorsque ces cellules se dédifférencient pour former un carcinome, la disparition de Bgp1 est un événement très précoce; cette protéine est déjà absente de tumeurs primaires de souris, équivalentes aux tumeurs humaines de stage A [19]. Il est donc possible que Bgp1 soit impliquée dans le processus de différenciation des cellules de l'épithélium du tube digestif. Son absence pourrait entraîner des défauts morphologiques dans le tube digestif des souris *bgp1* *-/-*. Ceux-ci pourraient être décelés par des analyses histologiques du tractus gastro-intestinal à différents stades du développement embryonnaire, post-natal et adulte.

La différenciation d'une cellule épithéliale est caractérisée par sa polarisation. L'absence de Bgp1 pourrait donc également entraîner une mauvaise polarisation de l'épithélium du petit intestin ou du côlon. Ce dernier point serait mis en évidence par des analyses immunohistochimiques en utilisant des anticorps contre des marqueurs connus de la polarisation de cet épithélium tels la phosphatase alcaline, la sucrase isomaltase et

l'aminopeptidase pour le domaine apical ou la laminine et le collagène de type IV pour le domaine basolatéral [20, 21].

Par ailleurs, l'une ou plusieurs des fonctions normales de l'intestin pourraient être affectées par la perte de Bgp1. Ainsi l'absorption d'eau, d'ions et de nutriments par le tube digestif pourraient être affectées et seraient vérifiées expérimentalement.

De plus, l'isoforme de Bgp1 possédant un long domaine cytoplasmique joue un rôle dans le transport des sels biliaires dans les hépatocytes (ce point sera discuté plus loin) [22]. Le côlon est un site de réabsorption des acides biliaires, permettant ainsi leur "recyclage" dans l'organisme par la circulation entéro-hépatique [23]. Ce phénomène joue un rôle important dans le contrôle physiologique du taux de cholestérol car les acides biliaires en sont dérivés. La fraction d'acides biliaires qui n'est pas réabsorbée par le côlon est la principale voie d'excrétion du cholestérol par l'organisme. La réabsorption des acides biliaires par le côlon et l'équilibre physiologique du cholestérol seraient donc potentiellement affectés et devraient être vérifiés.

Enfin, il est possible que Bgp1 soit impliqué dans la régulation de la colonisation bactérienne de l'intestin. En effet, certaines souches de bactéries *E.coli* d'origine humaine adhèrent à BGP, l'équivalent chez l'humain de Bgp1 [24]. L'état de la flore bactérienne des souris *bgp1* *-/-* devrait donc être évaluée.

### **Foie**

Durant l'embryogénèse, le foie est un site important d'hématopoïèse et de synthèse protéique. L'érythropoïèse, i.e. la formation d'érythrocytes, est essentielle à la

survie de l'embryon; sans globules rouges, celui-ci ne peut être convenablement oxygéné. Les malformations précoces du foie sont souvent létales [25].

Dans le foie, Bgpl est exprimée assez tardivement. Notre groupe de recherche ainsi que d'autres n'ont pu détecter cette protéine dans le foie entre 10,5 et 17,5 *dpc* [3, 26-28]. Il est donc peu probable que Bgpl soit importante pour la fonction d'hématopoïèse précoce du foie. Par contre, après 18,5 *dpc*, Bgpl est présent au domaine apical des hépatocytes des canalicules biliaires [3]. Son expression y est considérablement augmentée après la naissance et y est maintenue tout au long de la vie adulte [26-29].

Plusieurs observations laissent croire que Bgpl serait impliquée dans les processus de différenciation ou de contrôle de la prolifération des cellules hépatiques. C-CAM, l'équivalent de Bgpl chez le rat, est régulée à la baisse dans les lignées cellulaires de tumeur hépatique et dans les hépatomes de Morris [30]. De plus, C-CAM est régulée à la baisse suite à une hépatectomie partielle et ne retrouve un niveau normal d'expression que trois semaines après la résection [26]. La variation la plus importante de cette expression est observée, au niveau de l'ARNm, durant les premières 24 heures après la chirurgie. Cette période correspond à la vague majeure de division des hépatocytes durant la régénération du foie [31]. Ces résultats semblent indiquer que Bgpl doit être régulée à la baisse lorsque les hépatocytes prolifèrent et/ou se différencient. Nous en déduisons que cette protéine pourrait être impliquée dans la différenciation des hépatocytes (i.e. leur polarisation) ou dans le contrôle de leur prolifération. La différenciation des hépatocytes et leur prolifération seraient évaluées par

des analyses histologiques de la morphologie du foie et par des analyses immunohistochimiques en utilisant des anticorps reconnaissant des marqueurs de la polarisation des hépatocytes.

Bgp1 pourrait aussi jouer un rôle important dans une des fonctions physiologiques des hépatocytes. Ainsi, Bgp1 est active dans le transport des acides biliaires. En effet, la transfection de l'isoforme à domaine cytoplasmique long de C-CAM confère à des cellules COS la capacité de transporter le taurocholate (un acide biliaire) de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, et ce, malgré le fait que cette protéine ne possède qu'un seul domaine transmembranaire [22]. De plus, un des premiers groupes à purifier cette protéine le fit en utilisant sa propriété d'adhérer au taurocholate par son domaine cytoplasmique [32]. Comme il est improbable qu'une protéine ne comportant qu'un seul domaine membranaire puisse servir de transporteur transmembranaire, il est suggéré que Bgp1 s'associe avec elle-même ou avec une ou d'autre(s) protéine(s) pour remplir cette fonction. L'absence de Bgp1 pourrait donc interférer avec la production normale de la bile. L'analyse de la composition de la bile des souris *bgp1* *-/-* serait donc effectuée, en portant une attention particulière aux acides biliaires. De plus, comme la sécrétion d'acides biliaires dans la bile est la principale voie d'excrétion du cholestérol, le taux de cholestérol de ces souris devrait être analysé avec soin.

Finalement, ces souris pourraient développer avec le temps des maladies hépatiques dues à l'absence de Bgp1. La morphologie du foie ainsi que l'apparition dans le sérum de ces souris de signes biochimiques de maladies hépatiques, telle une augmentation de la bilirubine, devraient être surveillées.

## **Reins**

Vers 15,5 *dpc*, le mésoderme du métanéphros (i.e. du futur rein) exprime Bgpl [3]. Les cellules épithéliales des tubules rénaux proviennent des cellules du mésoderme du métanéphros [33]. En effet, sous l'effet inductif du bourgeon urétéral, certaines cellules du mésoderme du métanéphros se convertissent en cellules épithéliales pour former les tubules. Les cellules des tubules rénaux expriment également Bgpl, et ce, dès 15,5 *dpc* [3]. Cette expression y sera maintenue durant toute la vie adulte. Comme toujours dans les cellules épithéliales polarisées, Bgpl est présente au domaine apical de ces cellules. Il est donc possible que Bgpl joue un rôle dans la différenciation des cellules des tubules rénaux à partir du mésoderme du métanéphros ou dans leur fonction normale d'absorption. La morphologie des néphrons devra être vérifiée par des analyses histologiques, et la polarisation normale des cellules des tubules rénaux devra être confirmée par des analyses immunohistochimiques. La présence dans le sérum et l'urine de ces souris de signes biochimiques de désordres rénaux devra aussi être surveillée.

## **Épiderme**

Dans l'épiderme, Bgpl apparaît dès 8,5 *dpc*. Son expression y est maintenue et même augmentée tout au long de la gestation. Par contre, quand les précurseurs des follicules pileux apparaissent, ceux-ci n'expriment pas Bgpl. Ces structures sont dérivées des cellules de l'épiderme. Elles sont caractérisées par des changements dans les propriétés de prolifération et d'adhérence des cellules qui les forment. Bgpl pourrait donc jouer un rôle dans le développement de l'épiderme ou dans la formation des follicules pileux [3]. La peau pourrait présenter des défauts macroscopiques évidents,

comme dans le cas des souris *EGFR* *-/-* dont la peau est sèche, forme des pellicules et est dépourvue de poils [34]. Les anomalies pourraient également être plus subtiles. Il faudrait alors pour les détecter faire des analyses immunohistochimiques en utilisant des anticorps spécifiques aux marqueurs de la différenciation normale des couches de l'épiderme, comme la kératine 5 pour le stratum germinativum, la kératine 10 pour le stratum spinosum, la loricrine pour le stratum granulosum et la filaggrine pour le stratum corneum [34]. Par ailleurs, chez l'humain, BGP est considérée comme un marqueur de la différenciation des cellules des glandes sébacées de la peau [35]. Il est donc possible que les glandes cutanées soient affectées par l'absence de *Bgp1*. Ces dernières devraient donc être étudiées attentivement chez les souris *bgp1* *-/-*.

*Bgp1* est exprimée dans les cellules épithéliales d'un grand nombre de tissus. De façon générale, cette protéine y est présente lorsque la cellule est différenciée et polarisée. De plus, elle disparaît souvent dans des situations de dédifférenciation ou de prolifération cellulaires, normales ou pathologiques. Cela laisse penser que *Bgp1* serait impliquée dans le contrôle de la différenciation (polarisation) ou de la prolifération des cellules épithéliales. Alternativement, *Bgp1* pourrait être impliquée au niveau de la fonction normale de ces épithéliums. Dans tous les tissus épithéliaux exprimant cette protéine, ces thèmes formeront la base des analyses à poursuivre dans les souris *bgp1* *-/-*.

### **Tissu Musculaire**

Pendant le développement embryonnaire, il existe quelques types de cellules non-épithéliales qui expriment *Bgp1* de façon transitoire, tels les myoblastes secondaires et le mésoderme de quelques organes.

Dans les cellules musculaires, Bgpl n'est détectée que pendant une courte période, pendant les jours 13,5 et 15,5 de la gestation. Cette protéine est alors présente à la surface des myoblastes secondaires ou des myotubes secondaires adjacents aux myotubes primaires déjà formés. Ces derniers en sont toutefois clairement dépourvus [3]. Les analyses immunohistochimiques décrites au chapitre 2 de ce mémoire suggèrent que Bgpl est présente sur les myoblastes secondaires au moment où ceux-ci fusionnent pour former les myotubes secondaires. Il est facile d'imaginer qu'une molécule d'adhérence intercellulaire homotypique pourrait aider à la fusion de deux cellules. La présence de Bgpl n'a jamais été rapportée dans le muscle chez l'adulte. Ce mode d'expression suggère fortement que Bgpl pourrait jouer un rôle dans la formation des myotubes secondaires au cours du développement embryonnaire. Son absence pourrait entraîner des défauts musculaires dans les souris *hgp1* *-/-*. La morphologie et la différenciation normales des cellules musculaires des souris *hgp1* *-/-* seront vérifiées par des analyses histologiques et immunohistochimiques du tissu musculaire de ces souris, et le fonctionnement normal de leur système musculaire pourrait être testé par de simples tests physiologiques.

### **Mésenchyme**

La présence de Bgpl durant l'embryogénèse est également détectée dans le mésenchyme des organes suivants: méninges, derme, glandes salivaires, poumons, pancréas, palais et rein [3]. Les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme sont des processus importants durant le développement embryonnaire. Elles sont essentielles à la morphogénèse normale de nombreux organes. Bgpl, une molécule d'adhérence

intercellulaire, possiblement impliquée dans une cascade de transduction de signal de surcroît, pourrait très bien avoir un rôle à jouer dans ces interactions. Lors des études histologiques décrites ci-haut, une attention particulière devrait être accordée à ces organes, où des malformations pourraient survenir si Bgpl est absente lors d'interactions importantes pendant leur morphogénèse.

### Système immunitaire

Il existe une autre catégorie de cellules qui expriment Bgpl, soit les cellules du système hématopoïétique. En effet, la présence de Bgpl a été rapportée dans les mégacaryocytes, les plaquettes, les leucocytes polynucléaires, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B [29]. De plus, on a récemment découvert que des lymphocytes T humains fraîchement isolés expriment une faible quantité de BGP, cette expression étant augmentée *in vitro* après 2 ou 3 jours de stimulation à l'interleukine 2 [36]. Le même traitement induit l'expression de BGP dans un sous-groupe de cellules NK (CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>), généralement retrouvées dans le placenta [36].

Ainsi, Bgpl est exprimée dans plusieurs types de cellules hématopoïétiques. La fonction de Bgpl dans ces cellules n'est pas évidente. Il est possible que la différenciation de certains de ces types de cellules soit entravée par l'absence de Bgpl, ou que certaines de ces cellules voient leurs fonctions altérées ou empêchées. La présence d'un registre normal de cellules du système immunitaire devrait être vérifiée dans les souris *hgp1* <sup>-/-</sup>, par des analyses de cytométrie de flux sur les cellules du sang, de la rate, du thymus et de la moelle osseuse, en utilisant des anticorps contre des marqueurs spécifiques à certaines sous population de cellules immunitaires, par exemple CD4, CD8,

CD3 et CD45 pour les lymphocytes T, B220, CD5 et IgM pour les lymphocytes B, et Mac-1 pour les macrophages.

Si l'absence de *Bgp1* avait un effet sur le système immunitaire, il serait intéressant de croiser les souris *bgp1* *-/-* (si elles sont viables et fertiles) avec d'autres souches de souris portant des mutations affectant le système immunitaire. La relation entre *Bgp1* et le produit du gène muté dans ces autres souches pourrait être déduite à partir du phénotype des souris ainsi produites. Les souris "motheaten" (*me*) seraient particulièrement intéressantes puisque les mutations qui les affectent se trouvent dans le gène *Ptplc*, responsable de la synthèse d'une tyrosine phosphatase. Deux types de mutation existent dans ce gène, la première étant létale (*me*) et la seconde permettant la survie des souris jusqu'à neuf semaines (*me<sup>v</sup>*). Les souris *me<sup>v</sup>* démontrent des déficiences immunitaires importantes et de l'autoimmunité, qui se manifestent par une dermatite, une taille réduite, de l'arthrite et une pneumonie de type hémorragique causant la mort [37]. Cette phosphatase interagit avec le domaine cytoplasmique de *Bgp1* [18]. Le croisement des souris *bgp1* *-/-* et *me<sup>v</sup>* pourrait nous informer sur les interactions fonctionnelles entre ces deux protéines.

Comme il est mentionné plus haut, même dans le cas où l'absence de *Bgp1* causerait la mort des embryons avant leur naissance, il pourrait être possible de créer des souris de type sauvage avec un système immunitaire composé de cellules *bgp1* *-/-*. Dans ce cas, plusieurs des expériences discutées plus haut seraient possibles et permettraient d'obtenir des informations sur le rôle de *Bgp1* dans les cellules hématopoïétiques.

## ABSENCE DE PHÉNOTYPE ÉVIDENT

L'absence de Bgp1 pourrait ne causer aucun phénotype apparent. Il est en effet possible que, pour constater l'effet de l'absence de Bgp1, nous devions soumettre les souris *bgp1* *-/-* à des conditions anormales, ou tenter de déceler des altérations subtiles. D'après les informations déjà connues sur cette protéine, au moins trois hypothèses sont possibles.

### Tumorigénèse

Tout d'abord, il se peut que les souris *bgp1* *-/-* soient plus sensibles à la formation de tumeurs intestinales. En effet, tel que déjà discuté, Bgp1 est souvent régulé à la baisse dans les carcinomes du côlon. De plus, il est démontré que la réintroduction de l'isoforme de Bgp1 (ou de C-CAM) comportant un domaine cytoplasmique long dans des lignées de cellules tumorales de côlon (CT-51) [38] ou de prostate (PC-3) [39] inhibe la capacité qu'ont ces lignées cellulaires de former des tumeurs *in vivo*. Il semble donc que Bgp1 pourrait jouer un rôle dans le processus de tumorigénèse. Comme la disparition de Bgp1 est un événement précoce dans la progression tumorale du côlon, les souris *bgp1* *-/-* pourraient avoir tendance avec le temps à développer spontanément des polypes ou des tumeurs du côlon. Elles pourraient également être plus sensibles à la formation de tumeurs lorsque traitées avec le diméthylhydrazine, un agent carcinogène de l'intestin [40].

Par ailleurs, le croisement des souris *bgp1* *-/-* avec d'autres souches de souris mutantes démontrant une prolifération anormale de l'épithélium du côlon pourrait être

nécessaire pour faire apparaître l'effet de l'absence de Bgp1. On pourrait par exemple utiliser les souris *Min* ( pour "Multiple Intestinal Neoplasia"), qui portent une mutation dans un des allèles de leur gène "Adenomatous Polyposis Coli" (APC). Les souris *Min* développent des polypes intestinaux qui deviennent progressivement cancéreux [41]. Une déficience en APC constitue une des premières manifestations d'aberrations génétiques dans le cancer du côlon chez l'humain. Les souris *Min* × *bgp1*<sup>-/-</sup> pourraient avoir plus tendance que les souris *Min* × *bgp1*<sup>+/+</sup> à former des polypes, ou alors ceux-ci pourraient apparaître plus rapidement ou progresser plus rapidement vers le cancer.

### Résistance au MHV

La protéine Bgp1 étant le site de liaison du virus de l'hépatite (MHV) chez la souris [42], les souris *bgp1*<sup>-/-</sup> pourraient vraisemblablement être résistantes à ce virus. Il est cependant à noter que la protéine Bgp2 peut également servir de récepteur alternatif à ce virus, au moins dans un système *in vitro* de culture cellulaire [43]. On pourrait donc penser que les souris *bgp1*<sup>-/-</sup> ont peu de chances d'être résistantes au MHV. Les souris de souche SJL/J laissent supposer le contraire. En effet, elles possèdent un allèle de *bgp1* dont la séquence est différente de celle de *bgp1* chez les souris BALB/c et qui produit une protéine incapable d'assurer la fonction de récepteur pour le MHV, alors que leur gène *bgp2* est similaire à celui des souris BALB/c [43]. Les souris SJL/J sont néanmoins résistantes au virus MHV [44]. Dans le contexte de l'organisme complet, contrairement à la situation *in vitro*, Bgp2 n'est pas exprimée dans des sites qui favorisent l'infection par le MHV. Il se pourrait donc très bien que les souris *bgp1*<sup>-/-</sup> soient résistantes à ce

virus. La disponibilité d'une souris de lignée pure résistante à ce virus pourrait être intéressante à long terme.

### **Compensation Fonctionnelle de Bgp2**

Finalement l'absence de phénotype chez les souris *hgp1* *-/-* pourrait résulter de la compensation d'une autre protéine. La candidate la plus probable pour ce rôle est Bgp2. En effet, cette protéine est très similaire à Bgp1, tant par sa structure que par sa séquence. C'est une protéine attachée à la membrane cellulaire, comme Bgp1. Même si le seul isoforme connu de *hgp2* ne possède qu'un seul domaine Ig constant, au lieu de trois, comme les isoformes principaux de *hgp1*, et un domaine cytoplasmique court, les exons de ces domaines "manquants" sont présents dans le gène *hgp2* [43]. Ils pourraient peut-être être transcrits dans le cas où Bgp1 serait absente.

Le mode d'expression de Bgp2 est différent de celui de Bgp1: par des analyses Northern, l'ARNm de *hgp2* fut retrouvé en quantité abondante dans le rein des souris adultes, et en très faible quantité dans le côlon, le foie la rate et le thymus [43]. L'expression de Bgp2 pourrait potentiellement être régulé à la hausse à des sites inhabituels dans les souris *hgp1* *-/-* lui permettant ainsi de compenser pour l'absence de Bgp1. Des analyses Northern ou RT-PCR sur l'ARN des tissus étudiés, ou alors l'hybridation *in situ* ou l'histoimmunochimie permettront de vérifier cet aspect. Dans le cas où Bgp2 compenserait, ne serait-ce que partiellement, l'absence de Bgp1 dans les souris *hgp1* *-/-*, il serait toujours possible de tenter de faire la double ablation génique des gènes *hgp1* et *hgp2*, pour étudier la fonction physiologique des protéines Bgp chez la souris.

Dans ce chapitre étaient présentées des pistes pour analyser le phénotype des souris *bgp1*<sup>-/-</sup>. Les hypothèses formulées ici sont basées sur le mode d'expression et les fonctions connues de Bgp1. Les principales hypothèses suggèrent des problèmes au niveau de la blastula, du sac vitellin et du placenta au cours du développement, au niveau des épithéliums de l'intestin, du rein et de la peau, au niveau du foie et au niveau du système immunitaire. Les souris *bgp1*<sup>-/-</sup> fourniront éventuellement un modèle inestimable pour étudier la fonction physiologique de Bgp1.

## RÉFÉRENCES

- [1] Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science* 1994; 266: 1508-18.
- [2] Svalander PC, Odin P, Nilsson BO, Öbrink B. Trophoctoderm surface expression of the cell adhesion molecule cell-CAM 105 on rat blastocysts. *Development* 1987; 100: 653-60.
- [3] Daniels E, Létourneau S, Turbide C, Kuprina N, Rudinskaya T, Yazova AC, Holmes KV, Dveksler GS, Beauchemin N. Biliary glycoprotein 1 expression during embryogenesis: Correlation with events of epithelial differentiation, mesenchymal-epithelial interactions, absorption and myogenesis. *Dev Dynamics* 1996; 206: 272-90.
- [4] Strickland S, Richards WG. Invasion of the trophoblasts. *Cell* 1992; 71: 355-57.
- [5] Robertson EJ. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach. IRL Press. 1987.
- [6] Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* 1995; 267: 246-49.
- [7] Mortensen RM, Conner DA, Chao S, Geisterfer-Lowrance AAT, Seidman JG. Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5: 2391-95.

- [8] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 12: 7634-38.
- [9] Beddington RSP, Robertson EJ. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 1989; 105: 733-37.
- [10] Epstein CJ, Smith S, Cox DR. Production and properties of mouse trisomy 15 diploid chimaeras. *Dev Genet* 1984; 4: 159-65.
- [11] Epstein CJ, Smith SA, Zamora T, Sawicki JA, Magnuson TR, Cox DR. Production of viable adult trisomy 17 diploid mouse chimaeras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 4379-80.
- [12] Sibilian M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 1995; 269: 234-37.
- [13] Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, Barnard JA, Yuspa SH, Coffey RJ, Magnuson T. Targeted disruption of mouse EGF receptor: Effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995; 269: 230-33.
- [14] Olson EN, Arnold HH, Rigby PWJ, Wold BJ. Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene *MRF4*. *Cell* 1996; 85: 1-4.
- [15] Smith CS, Wright NA. Aspects of gut development. *Proc Nutrition Soc* 1996; 55: 519-27.

- [16] Crossman MW, Hauff SM, Gordon JI. The mouse ileal lipid-binding protein gene: a model for studying axial patterning during gut morphogenesis. *J Cell Biol* 1994; 126: 6: 1547-64.
- [17] Frängsmyr L, Baranov V, Prall F, Moorix MWY, Wagener C, Hammarström S. Cell- and Region-specific expression of biliary glycoprotein and its messenger RNA in normal human colonic mucosa. *Cancer Res* 1995; 55: 2963-67.
- [18] Beauchemin N, Kunath T, Robitaille J, Chow B, Turbide C, Daniels E, Veillette A. Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene*, sous presse, 1997.
- [19] Rosenberg M, Nédellec P, Jothy S, Fleiszer D, Turbide C, Beauchemin N. The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is down-regulated in malignant mouse tissues. *Cancer Res* 1993; 53: 4938-45.
- [20] Messer M, Dahlquist A. A one-step ultramicro method for the assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* 1966; 14: 376-92.
- [21] Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 136.
- [22] Sippel CJ, Fallon RJ, Perlmutter D. Bile acid efflux mediated by the rat liver canalicular bile acid transport/Ecto-ATPase protein requires serine 503 phosphorylation and is regulated by tyrosine 488 phosphorylation. *J Biol Chem* 1994; 269: 19539-45.
- [23] Granner DK, Mayes PA, Murray RK, Rodwell VW. Précis de Biochimie. 7e édition. Les Presses de l'Université Laval. Éditions ESKA. 1989.

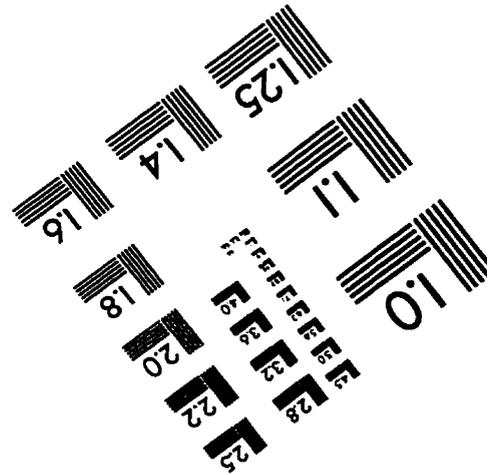
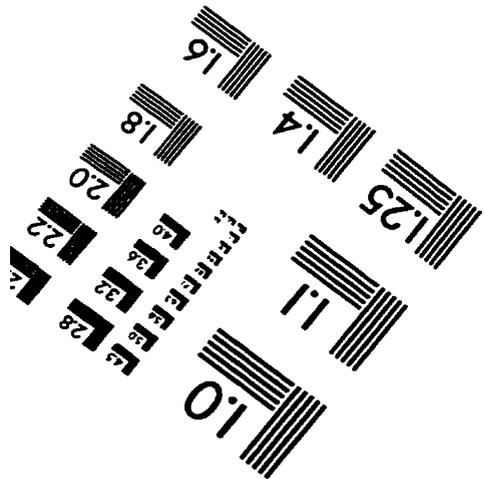
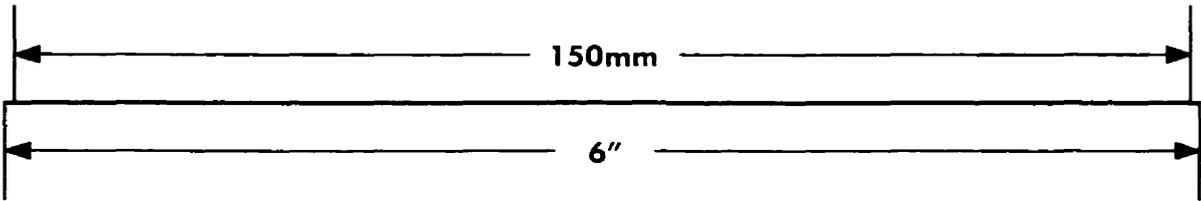
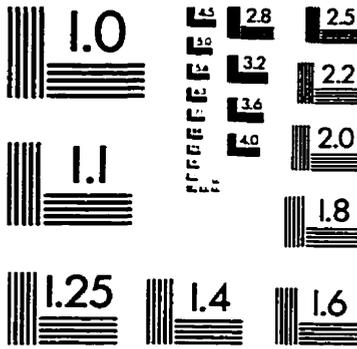
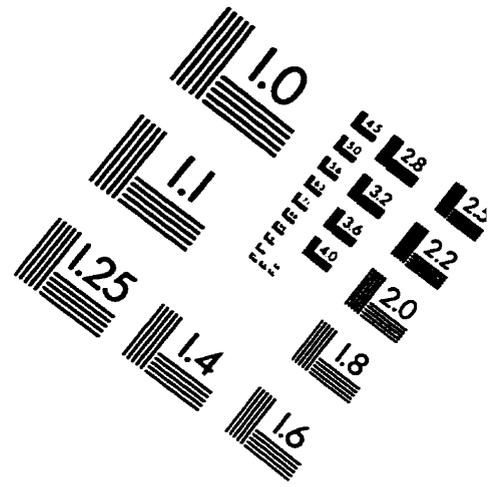
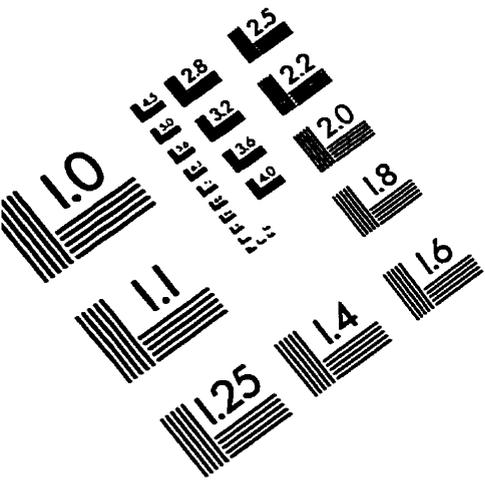
- [24] Leusch HG, Hefta SA, Drzeniek Z, Hummel K, Markos-Pusztai Z, Wagener C. *Escherichia coli* of human origin binds to carcinoembryonic antigen (CEA) and non-specific crossreacting antigen (NCA). *FEBS Lett* 1990; 261: 405-9.
- [25] Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R, Grosveld F. Defective hematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* 1995; 375: 316-22.
- [26] Odin P, Öbrink B. Dynamic expression of the cell adhesion molecule cell-CAM 105 in fetal and regenerating rat liver. *Exp Cell Res* 1986; 164: 103-14.
- [27] Cheung PH, Luo W, Qiu Y, Zhang X, Earley K, Millirons P, Lin S-H. Structure and function of C-CAM1. The first immunoglobulin domain is required for intercellular adhesion. *J Biol Chem* 1993; 268: 24303-10.
- [28] Thompson NL, Panzica MA, Hull G, Lin S-H, Curran TR, Gruppuso PA, Baum O, Reutter W, Hixson DC. Spatiotemporal expression of two cell-cell adhesion molecule 105 isoforms during liver development. *Cell Growth and Diff* 1993; 4: 257-68.
- [29] Beauchemin N, Lin SH. (sous presse). Role of C-CAM as a tumour suppressor. "Cell Adhesion and Communication", C.P. Stanners (ed.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, chap. 9.
- [30] Becker A, Neumaier R, Park CS, Gossrau R, Reutter W. Identification of a transformation-sensitive 110-kDa plasma membrane glycoprotein of rat hepatocytes. *Eur J Cell Biol* 1985; 39: 417-23.

- [31] Thompson NL, Lin S-H, Panzica MA, Hixson DC. Cell CAM 105 isoform RNA expression is differentially regulated during rat liver regeneration and carcinogenesis. *Pathobiology* 1994; 62: 209-20.
- [32] Svenberg T. Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile: Isolation and partial characterization. *Int J Cancer* 1976; 17: 588-96.
- [33] Herzlinger D. Inductive interactions during kidney development. *Seminars in Nephrology* 1995; 15: 4: 255-62.
- [34] Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995; 376: 337-41.
- [35] Metze D, Soyer HP, Zelger B, Neumaier M, Grunert F, Hartig C, Amann U, Bhardwaj R, Wagener C, Luger T. Expression of a glycoprotein of the carcinoembryonic antigen family in normal and neoplastic sebaceous glands. Limited role of carcinoembryonic antigen as a sweat gland marker. *J Amer Acad Derm* 1996; 34: 735-44.
- [36] Möller MJ, Kammerer R, Grunert F, von Kleist S. Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population. *Int J Cancer* 1996; 65: 740-45.
- [37] Bignon JS, Siminovitch KA. Identification of PTP1C mutation as the genetic defect in motheaten and viable motheaten mice: a step toward defining the roles of protein tyrosine phosphatases in the regulation of hemopoietic cell differentiation and function. *Clin Immunology Immunopathology* 1994; 73: 2: 168-79.

- [38] Kunath T, Ordonez C, Turbide C, Beauchemin N. Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene* 1995; 11: 2375-82.
- [39] Hsieh JT, Luo W, Song W, Wang Y, Kleinerman DI, Van NT, Lin S-H. Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) in prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches. *Cancer Res* 1995; 55: 190-97.
- [40] Brattain MG, Strobel-Stevens J, Fine D, Webb M, Sarrif AM. Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res* 1980; 40: 2142-46.
- [41] Fodde R, Edelman W, Yang K, van Leeuwen C, Carlson C, Renault B. A targeted chain-termination mutation in the mouse *Apc* gene results in multiple intestinal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 19: 8969-73.
- [42] Dveksler GS, Pensiero MN, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, Basile AA, Elias PE, Holmes KV. Mouse coronavirus MHV-A59 and blocking anti-receptor monoclonal antibody bind to the N-terminal domain of cellular receptor MHVR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1716-20.
- [43] Nédellec P, Dveksler GS, Daniels E, Turbide C, Chow B, Basile AA, Holmes KV, Beauchemin N. *Bgp2*, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J Virol* 1994; 68: 4525-37.
- [44] Dveksler GS, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, McCuaig K, Pensiero MN, Jiang GS, Beauchemin N, Holmes K. Several members of the mouse carcinoembryonic

antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J Virol* 1993; 67: 1-8.

# IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)




**APPLIED IMAGE, Inc**  
 1653 East Main Street  
 Rochester, NY 14609 USA  
 Phone: 716/482-0300  
 Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved