

Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Le cours de cette année a été consacré à la lysogénie. Après avoir rappelé les méthodes et les techniques propres à l'étude du bactériophage en général, on a limité l'analyse aux propriétés du phage tempéré λ .

Lors de l'infection d'une bactérie sensible, l'ADN du phage est injecté dans la bactérie. Là, deux séries d'événements peuvent se produire. Ou bien toutes les fonctions du phage sont exprimées, le phage se reproduit et la bactérie se lyse en libérant une centaine de particules infectieuses en tous points identiques à celle utilisée pour l'infection (cycle de reproduction végétative). Ou bien la série d'événements déclenchés dans la bactérie par l'irruption de l'ADN viral n'atteint pas son terme ; la bactérie survit et dans sa descendance se trouvent des bactéries chez lesquelles l'ADN du phage est passé à l'état de prophage : l'ADN viral est inséré en une région précise du chromosome bactérien (lysogénisation). Les bactéries ainsi lysogénisées poursuivent normalement leur croissance. Les fonctions gouvernées par le prophage et nécessaires à la production de particules infectieuses sont inhibées grâce à la présence d'un système de répression établi par le prophage lui-même. L'intérêt de la lysogénie consiste donc dans le fait que le chromosome d'un phage, correspondant à une molécule d'ADN de quelques millions en poids moléculaire, peut venir s'insérer dans le chromosome bactérien ; là, les fonctions gouvernées par cet ADN restent muettes grâce au système spécifique de répression, désigné sous le nom d'immunité. Au cas où cette immunité vient à disparaître par inactivation du répresseur, les fonctions phagiques sont alors exprimées : ceci se traduit par la synthèse de toute une série de protéines spécifiques, synthèse qui s'effectue selon un programme rigoureux et étroitement coordonné. Les points suivants ont été examinés plus en détail :

L'ADN du bactériophage λ se compose d'une molécule, de poids moléculaire 32×10^6 et longue d'environ 16μ , d'après les mesures effectuées au microscope électronique. Ceci correspond donc à 45 ou 50 000 paires de bases. La distribution des bases n'est pas homogène le long de la molécule et l'on peut distinguer trois segments différents : un segment, représentant 42 % de la molécule contient une proportion de bases GC/total = 56 % ; un autre segment égal à 41 % de la molécule contient seulement 41 % de paires de GC ;

ces deux segments sont unis entre eux par une petite région représentant 11 % du DNA et contenant une proportion de bases GC égale seulement à 41 %.

Dans certaines conditions de température, force ionique et pH, la molécule peut se circulariser de façon non covalente. Il existe en effet à chaque extrémité un « site de cohésion » formé, sur une longueur d'environ 20 nucléotides, par une chaîne unique, à extrémité 5'. Les deux séquences étant complémentaires, la molécule peut se refermer sur elle-même dans certaines conditions et l'action de la polynucléotide ligase scelle la fermeture de la molécule par une liaison covalente. Ainsi sont obtenues des structures circulaires, covalentes, à doubles chaînes.

KAISER et HOGNESS ont mis au point un système qui permet d'infecter les bactéries par l'ADN purifié de λ grâce à la coopération d'un phage intact, génétiquement proche. Grâce à cette technique, il devient possible d'analyser les effets biologiques de traitements physiques ou chimiques variés appliqués à l'ADN de λ . On peut également établir une corrélation entre la localisation de différents marqueurs génétiques au long de la molécule, et la structure de cette molécule.

La relation entre prophage et chromosome bactérien peut être analysée par des méthodes génétiques. Comme tout autre caractère bactérien, le caractère lysogène se prête à l'analyse génétique au cours des croisements bactériens. En outre, on peut croiser des souches mâles et femelles, hébergeant toutes deux des prophages λ mais que l'on peut distinguer par des caractères génétiques. On constate ainsi que le prophage λ est fixé en un point particulier du chromosome bactérien, non loin des gènes qui assurent la fermentation du galactose par les bactéries. L'étude de divers phages tempérés, d'immunité différente, montre que pour chacun de ces phages, il existe sur le chromosome bactérien un site particulier sur lequel est fixé le prophage homologue.

Si l'on dispose de caractères génétiques bactériens situés de part et d'autre d'un prophage et suffisamment près de lui, on peut rechercher si le prophage est ou non inséré dans la continuité du chromosome bactérien : la présence du prophage doit en effet distendre la liaison entre ces caractères bactériens. En d'autres termes, chez les bactéries lysogènes, la liaison entre ces caractères devrait être moins forte que chez les bactéries lysogènes. C'est en effet ce qu'a montré l'expérience. Le prophage λ est situé entre les caractères galactose et biotine de la bactérie. Alors que par transduction à l'aide du phage P1, la liaison trouvée entre galactose et biotine est de 47 % lorsque les bactéries donatrices et réceptrices, sont non lysogènes, elle n'est plus que de 3,5 % lorsque les bactéries sont lysogènes.

De telles expériences peuvent aussi être déduites l'ordre des caractères génétiques du phage le long du prophage. On obtient aussi une carte génétique du prophage qui est différente de la carte obtenue chez le phage végétatif. Ces deux structures peuvent toutefois être déduites l'une de l'autre par permutation

circulaire. Selon toute vraisemblance, l'intégration des deux structures initiales, ADN bactérien et ADN du phage, en une structure unique résulte d'une recombinaison réciproque entre deux éléments circulaires selon le schéma proposé par CAMPBELL.

L'intégration du prophage devrait, selon ce schéma, mettre en jeu deux éléments distincts. D'une part, un élément structural permettant l'appariement spécifique de l'ADN du phage avec une région homologue du chromosome bactérien ; d'autre part, un système enzymatique permettant une recombinaison entre les segments appariés. C'est bien ce que semble confirmer l'analyse des mutants du phage λ . Tout d'abord, il existe des mutants qui ont perdu la propriété de s'intégrer. Après infection, le système de répression qui inhibe les fonctions du phage peut s'établir normalement, mais l'ADN du phage ne peut s'insérer dans le chromosome bactérien. L'ADN phagique, incapable alors de se répliquer, est dilué par la croissance des bactéries. De tels mutants, désignés sous le nom de b_2 , possèdent, en gradients de densité, une densité inférieure à celle du type sauvage. La différence de densité correspond à une diminution de l'ADN pouvant atteindre 18 % de la molécule totale. L'examen, au microscope électronique, de l'ADN extrait du mutant b_2 montre que la molécule d'ADN est en effet plus courte que celle extraite de la souche sauvage, la différence étant d'environ 15 à 18 %.

En outre, il existe d'autres mutants de λ chez lesquels on peut démontrer la perte d'un système enzymatique permettant l'intégration. La lysogénéisation ne peut s'effectuer après infection simple. Elle n'a lieu qu'en infection mixte avec le type sauvage. Ce système enzymatique paraît absolument spécifique du phage et de la région homologue du chromosome bactérien, différents types de phages localisés en différentes régions du chromosome bactérien possédant des enzymes différents. Récemment a été mise en évidence l'existence chez λ d'un autre système enzymatique permettant la recombinaison génétique tout au long du génome phagique.

Le système de répression qui assure l'immunité est déterminée par une étroite région du chromosome phagique. Un seul cistron, désigné par C_I , paraît déterminer la structure du répresseur. Plusieurs types de mutations ont été isolées qui modifient les propriétés du répresseur. Les phages portant une mutation C_I^- sont incapables de lysogéniser en infection mixte avec un phage C_I^+ . Les bactéries doubles lysogènes C_I^-/C_I^+ produisent, au cours de la multiplication bactérienne, des clones lysogènes simples qui sont toujours de type C_I^+ , jamais C_I^- . C'est ce que l'on attend d'un phage qui, incapable de former un répresseur actif, ne pourrait maintenir de façon stable un système lysogène. Dans un second type de mutant C_I , désigné comme ind^- , le répresseur est devenu insensible à l'action du rayonnement ultraviolet, de la mitomycine, etc.,

agents connus pour inactiver indirectement le répresseur de type sauvage C_I^+ . Ces deux types de mutations C_I^- et C_I^{ind-} sont en tous points semblables aux mutations qui modifient le répresseur de l'opéron lactose d'*E. coli* et permettent d'établir une analogie entre les deux systèmes. Enfin, certaines mutations C_I entraînent la formation d'un répresseur soit thermosensible, soit actif seulement en présence d'un suppresseur bactérien de type *amber*. Ces propriétés démontrent la nature protéique du répresseur.

Le répresseur du phage λ a récemment été isolé par Ptashne, en surinfectant des bactéries lysogènes dans des conditions où le répresseur est à peu près la seule protéine formée. Il s'agit d'une protéine acide, qui en gradient de sucrose, sédimente avec une constante de 2,8 S. Ceci correspond à un poids moléculaire d'environ 30 000, mais selon toute vraisemblance la protéine isolée représente une sous-unité de la molécule de répresseur. La protéine isolée se fixe spécifiquement sur l'ADN homologue natif. Elle ne se fixe ni sur l'ADN homologue dénaturé, ni sur l'ADN natif de phages présentant une spécificité d'immunité distincte de λ .

Les sites d'action du répresseur peuvent être analysés grâce aux mutants dits virulents, qui échappent à l'immunité établie par le répresseur. Ces mutants sont en fait complexes et le phénotype virulent exige la présence d'au moins deux mutations situées de part et d'autre du gène C_I . La répression semble aussi s'exercer directement sur les deux groupes de fonctions, déterminées par les gènes localisés autour du gène C_I .

L'existence d'un programme qui échelonne dans le temps les synthèses protéiques du phage est démontrée par l'étude cinétique des différentes fonctions du phage que nous sommes en mesure de déceler. Après inactivation du répresseur chez les bactéries lysogènes, s'exprime tout d'abord une série de fonctions qui ont été baptisées « précoces ». Il semble exister deux groupes de fonctions précoces. D'une part, un opéron directement inhibé par le répresseur, et qui détermine les fonctions (O et P) nécessaires à la réplication végétative de l'ADN de λ . D'autre part, un groupe de gènes qui assurent la synthèse d'une exonucléase et de plusieurs enzymes permettant la sortie du prophage et la recombinaison. Selon toute vraisemblance, ces gènes ne sont pas inhibés directement par le répresseur, mais leur expression paraît dépendre de l'expression préalable d'un gène de régulation (N) qui, lui, est directement inhibé par le répresseur.

Une fois les produits des gènes O et P formés, la réplication de l'ADN du phage peut s'effectuer. En outre, le gène régulateur N entraîne l'expression d'un autre gène régulateur (Q). Une fois l'ADN phagique en voie de réplication, le gène Q permet l'expression de toute une série de fonctions désignées sous le nom de « tardives ». Ces fonctions tardives correspondent essentiellement aux protéines de structure qui s'assemblent avec l'ADN

phagique pour former la particule infectieuse. Cet assemblage de la particule infectieuse semble, au moins dans certaines étapes, pouvoir s'effectuer *in vitro*.

On voit l'extraordinaire complexité du programme de régulation qui détermine avec rigueur la séquence des événements au cours de la reproduction du phage. Et l'ADN du phage λ est l'un des plus simples que l'on connaisse puisqu'il correspond à seulement 45 ou 50 000 paires de bases, c'est-à-dire 10^6 fois moins qu'une souris !

SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires consacrés à quelques aspects de la chimie du bactériophage.

M. Charles RADDING, professeur à l'Université de Yale, a donné deux séminaires sur l'ADN du phage, structure et répllication.

M. Aaron NOVICK, professeur à l'Université d'Oregon, a donné un séminaire sur la physiologie de l'infection et un sur la morphogenèse du phage.

M. Luiz Pereira da SILVA, maître de recherches au C.N.R.S., a donné deux séminaires sur l'organisation du génome phagique et sur sa transcription.

M. Gérard BUTTIN, sous-directeur de laboratoire au Collège de France, a donné une série de trois séminaires : deux consacrés à la recombinaison génétique du bactériophage et un aux phages à ARN.

ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

Dans le laboratoire, situé à l'Institut Pasteur, se sont poursuivies les recherches sur les mécanismes génétiques et la régulation des synthèses de macromolécules dans la cellule bactérienne.

Mécanismes gouvernant la régulation des synthèses protéiques

L'analyse du gène régulateur *i* et de l'opérateur *o*, qui déterminent la boucle d'induction du système lactose d'*E.coli*, a été poursuivie grâce au système permettant la sélection de rares clones de type sauvage au sein de populations constitutives, de type i^- ou o^c (Julian Davies). Toutes les mutations i^- et i^s étudiées paraissent localisées dans un seul segment du chromosome bactérien, segment correspondant à un seul groupe de complémentation. Toutes les mutations o^c , qui semblent être la conséquence de délétions, sont localisées dans un petit segment situé entre *i* et *z*, le gène gouvernant la structure

de la β -galactosidase. Par la mesure des fréquences de recombinaison, la longueur du segment i correspond environ au quart de celle du gène z , et celle de o au tiers de celle de i . Cette estimation ne prend de valeur que dans la mesure où les probabilités de recombinaison par longueur d'ADN restent constantes le long du chromosome, ce qui n'est pas établi. Mais la valeur trouvée pour i est compatible avec le poids moléculaire d'environ 30 000 trouvé pour la sous-unité du répresseur lactose, le produit de i .

L'analyse des systèmes permettant la biosynthèse et la dégradation de la proline par *E.coli* a été poursuivie (Hubert CONDAMINE). De nouveaux mutants, chez lesquels l'un ou l'autre système était modifié, ont été isolés. Certaines de ces mutations présentent des propriétés insolites et conduisent à prévoir, dans la voie de biosynthèse, un système régulateur quelque peu différent des systèmes connus.

L'analyse génétique de la fermentation du maltose par *E.coli* montre l'existence de deux groupes de gènes localisés en deux régions du chromosome bactérien (Maltose A et B). De nombreux mutants de la région A ont été isolés et caractérisés biochimiquement et génétiquement (Maurice HOFNUNG). En outre, des épisomes F' ont été obtenus qui hébergent la région maltose A. Il devient donc possible de construire des souches diploïdes pour cette région et d'en effectuer l'analyse fonctionnelle.

Des quantités importantes de l'enzyme DNA-RNA polymérase ont été préparées et purifiées. L'analyse physico-chimique de l'enzyme révèle la présence de plusieurs sous-unités qui sont maintenant à l'étude (Charles BABINET). En outre, des mutants thermosensibles ont été isolés qui, à 40°, s'avèrent incapables de synthétiser l'ARN.

Mécanismes gouvernant la synthèse d'ADN et coordonnant sa régulation avec la division cellulaire

De nombreux mutants thermosensibles ont été isolés, qui se multiplient normalement à 30°, mais non à 40°. Chez certains de ceux-ci, la synthèse d'ADN est bloquée, soit immédiatement, soit après 30 ou 40 minutes. En aucun cas, jusqu'à présent, on n'a pu trouver une lésion biochimique précise pour expliquer cet arrêt. Les précurseurs sont présents en quantité normale et les activités enzymatiques que l'on sait mettre en évidence paraissent normales. Chez l'un des mutants, cependant, on observe à 40°, une dégradation rapide de l'ADN préalablement formé dans la culture à 30°. Ceci conduit à étudier cette mutation en liaison avec celles dont on sait déjà qu'elles empêchent la réparation de certaines lésions de l'ADN et parfois la recombinaison génétique (Gérard BUTTIN et Michel WRIGHT).

Chez d'autres mutants thermosensibles, la division cellulaire est arrêtée à 40°. Parmi eux, on observe toute une gamme de phénotypes différents et l'on peut, par des méthodes génétiques, distinguer une variété de mutations inhibant la division cellulaire. Certaines d'entre elles manifestent un effet sur

toute une série de fonctions (synthèse de l'ADN, séparation des noyaux, formation du septum) ; selon toute vraisemblance, elles perturbent une étape du programme de régulation qui détermine la séquence des événements lors de la division cellulaire. D'autres, au contraire, n'inhibent qu'une seule étape et paraissent modifier un constituant structural, dans la membrane (Yukinori HIROTA).

L'ADN bactérien est lié à la membrane et l'on a maintenant toutes raisons de penser que la réplication se fait dans la membrane, par rotation de l'ADN dans un complexe enzymatique. Il devient important alors de préciser les relations qui existent entre la membrane et le « vieil » ADN. Après réplication de l'ADN et séparation des deux copies ainsi formées, les « vieux » brins d'ADN occupent-ils toujours une même position, vers le pôle de la bactérie par exemple ou vers le centre ? Au contraire, à chaque réplication, les vieux brins ont-ils 50 % de chance d'aller d'un côté ou de l'autre ? L'expérience a pu être faite, après marquage de l'ADN avec de la thymidine tritiée, en laissant les individus bactériens croître sous forme de chaînettes et en analysant, par autoradiographie, la position de la radioactivité dans les chaînettes. Chez *B. subtilis* comme chez *E. coli*, il n'y a aucune ambiguïté : la répartition des « vieux » brins d'ADN s'effectue au hasard (Antoinette RYTER et Yukinori HIROTA).

Analyse génétique et physiologique du bactériophage

Parmi les fonctions précoces du phage, la fonction N joue un rôle particulier en ce qu'elle commande l'expression de toute une série de gènes, et notamment les fonctions exigées pour que le prophage puisse quitter le chromosome bactérien dans lequel il s'est inséré. Les bactéries lysogènes, hébergeant un prophage dont le répresseur est thermosensible et qui portent une mutation N, sont tuées lorsque la culture est portée à 40°, ce qui lève la répression. Cet effet de la dérégulation semble être dû à une synthèse anormale de l'ADN chez les mutants du prophage porteurs d'une mutation N. Une série de clones a été isolée, qui eux, forment des colonies à 40°. Cette propriété est due à la présence d'une seconde mutation qui détériore soit la fonction O, soit la fonction P, soit les deux à la fois. Les deux fonctions O et P semblent être nécessaires et suffisantes pour déterminer une réplication de l'ADN qui, débutant sur le prophage, se poursuit le long du chromosome bactérien. L'étude des doubles mutants et de leurs propriétés permet en outre de mettre en évidence un réseau de régulations complexes qui détermine l'ordre avec lequel les différents gènes du phage sont exprimés dans le temps. Il apparaît notamment que l'opéron contenant le gène régulateur C_I forme un produit dont la présence est nécessaire pour que se poursuive l'expression de l'opéron. En l'absence de ce produit, après sa destruction par exemple, le gène régulateur ne peut plus s'exprimer, et la bactérie lysogène se trouve irréversiblement engagée dans la voie qui mène à la production de phages (Luiz Pereira da SILVA et Harvey EISEN).

Les propriétés trouvées aux bactéries lysogènes portant une mutation N étayent l'hypothèse déjà formulée, selon laquelle la réplication de l'ADN de λ doit être assurée par un système enzymatique particulier et débiter en un point particulier de l'ADN de λ . On peut proposer un modèle pour rendre compte des modalités actuellement connues de cette réplication et notamment pour expliquer la présence de longues formes linéaires représentant plusieurs fois la longueur de l'ADN isolé du phage infectieux. Selon ce schéma, l'ADN du phage, ou du prophage, commencerait par se refermer de façon covalente en une structure circulaire à deux brins. Puis l'une des chaînes de cette structure serait ouverte en un point précis. A l'une des extrémités ainsi formées, la chaîne ouverte se prolongerait par la copie de l'autre chaîne. Celle-ci restant toujours fermée, la copie se poursuivrait sans fin autour du cercle ainsi formé. A l'autre extrémité de la chaîne ouverte, débiterait une réplication qui, commençant le long de cette chaîne se poursuivrait sur la copie de l'autre chaîne qui vient d'être faite. A la fin de la période de latence un enzyme, agissant sur cette longue structure à deux chaînes au niveau des régions formant les sites de cohésion découperait l'ADN à la mesure d'un génome de phage. Cette hypothèse présente la particularité d'être asymétrique. Les deux chaînes ne sont pas copiées de la même façon. L'une des chaînes est copiée une fois seulement. Toutes les copies, sauf une, sont à l'image de l'autre chaîne, celle qui reste fermée durant tout la réplication. Cette hypothèse se prête à de nombreuses épreuves expérimentales qui sont actuellement en cours (Alex FRITSCH et Françoise de VITRY).

PUBLICATIONS

G. BUTTIN, J. MONOD et F. JACOB, *The operon : A unit of coordinated gene action (Heritage from Mendel, University Press Madison, 1967, p. 155-177).*

F. CUZIN et F. JACOB, *Bacterial episomes as a model of replicon (Regulation of nucleic acid and protein biosynthesis, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1967, p. 39-50).*

A. ULLMANN, F. JACOB et J. MONOD, *Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of Escherichia coli (J. Mol. Biol., 1967, 24, p. 339-343).*

F. JACOB, *Biologie moléculaire (Sciences, 1967, n° 47, p. 71-78).*

F. CUZIN et F. JACOB, *Mutations de l'épisome F d'Escherichia coli K 12. I. Mutations défectives (Ann. Inst. Pasteur, 1967, 112, p. 1-9).*

— *Mutations de l'épisome d'Escherichia coli K 12. II. Mutants à réplication thermosensible (Ann. Inst. Pasteur, 1967, 112, p. 397-418).*

A. RYTER et F. JACOB, *Ségrégation des noyaux pendant la croissance et la germination de B. subtilis* (C. R. Acad. Sci., 1967, 264, p. 2254-2256).

F. CUZIN et F. JACOB, *Existence chez Escherichia coli K 12 d'une unité génétique de transmission formée de différents réplicons* (Ann. Inst. Pasteur, 1967, 112, p. 529-545).

— *Association stable de deux épisomes F différents dans un clone d'Escherichia coli* (Ann. Inst. Pasteur, 1967, 113, p. 145-155).

F. CUZIN, G. BUTTIN et F. JACOB, *On the mechanism of genetic transfer during conjugation of Escherichia coli* (J. Cell. Physiol., 1967, 70, p. 77-88).

L. H. Pereira da SILVA et F. JACOB, *Induction of C_{II} and O functions in early defective lambda prophages* (Virology, 1967, 23, p. 618-624).

A. RYTER et F. JACOB, *Membrane et ségrégation nucléaire chez les bactéries* (Protides of the Biological Fluids, 1967, 15, p. 267-278).

E. P. KIRBY, F. JACOB et D. A. GOLDTHWAIT, *Prophage induction and filament formation in a mutant strain of Escherichia coli* (Proc. Nat. Acad. Sci., 1967, 58, p. 1903-1910).

G. BUTTIN, H. EISEN et F. JACOB, *Enzymatic synthesis of DNA and chromosome replication* (7^e Congrès international de Biochimie, Tokyo, 1967, 91-92 (Abstract I, Symposium V)).

G. BUTTIN et F. JACOB, *Génétique de la cellule bactérienne* (7^e Assemblée mondiale de l'Association médicale israélienne, Tel Aviv, 1967).

C. BABINET, *A new method for the purification of RNA-polymerase* (Biochem. Biophys. Res. Com., 1967, 26, p. 639-644).

A. RYTER, C. FREHEL et B. FERRANDES, *Comportement des mésosomes lors de l'attaque de B. subtilis par le lysozyme en milieu hyper- ou hypotonique* (C. R. Acad. Sci., 1967, 265, p. 1259-1262).