

Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Le cours de cette année a été consacré à l'étude des épisomes bactériens. On a rappelé tout d'abord comment l'analyse des bactériophages tempérés d'une part, celle du facteur sexuel d'*E.coli* d'autre part, avaient révélé une analogie remarquable dans le comportement de ces deux unités. Celles-ci ont alors été réunies dans une même classe d'éléments génétiques auxquels a été donné le nom d'épisomes. Il s'agit d'éléments qui ne déterminent pas de fonction essentielle à la croissance ou à la division cellulaire et qui, par conséquent, ne sont pas indispensables à la bactérie. En l'absence d'épisome, la bactérie est capable de croître parfaitement. Un épisome peut être introduit dans la cellule bactérienne par l'un des divers mécanismes de transfert connus chez les bactéries. Lorsqu'un épisome est présent dans une bactérie, il peut exister sous deux formes bien distinctes. Ou bien il se reproduit de façon autonome sans liaison aucune avec le chromosome de la bactérie-hôte. Ou bien, au contraire, il est incorporé dans le chromosome de l'hôte et se multiplie alors comme un segment de celui-ci. La présence d'un épisome dans une bactérie confère à celle-ci des propriétés nouvelles dues à l'expression des fonctions qu'il régit. Outre les fonctions particulières à chacun des éléments, les épisomes possèdent en commun deux propriétés : la capacité de se répliquer de façon autonome ; la capacité de s'insérer dans le chromosome bactérien ou de s'en libérer. C'est surtout ce dernier aspect qui a été analysé au cours de l'année. L'idée qu'un segment d'ADN puisse venir s'ajouter à un chromosome, ou s'en détacher, est en effet relativement nouvelle. Elle présente beaucoup d'intérêt aujourd'hui, en raison notamment de la découverte, dans les cellules eucaryotes, de petites molécules circulaires d'ADN de tailles variables.

C'est chez le phage tempéré lambda que sont le mieux connus les mécanismes de l'intégration dans le chromosome ainsi que les facteurs en jeu. Pendant longtemps, l'ignorance des relations moléculaires entre le prophage et le chromosome de l'hôte a conduit à considérer toute une série de modèles où l'ADN du phage était, d'une façon ou d'une autre, attaché à l'ADN bactérien sans être inséré dans la continuité de celui-ci. Aujourd'hui, il existe toute une série d'arguments, tant génétiques que physico-chimiques, qui démontrent l'insertion du prophage lambda dans le chromosome bactérien,

à un endroit précis de ce dernier, localisé entre les caractères gouvernant la fermentation du galactose (gal) d'un côté et la synthèse de la biotine (bio) de l'autre. On peut, ainsi que l'a proposé Campbell, se représenter l'intégration des deux structures initiales, l'ADN du phage et celui de la bactérie-hôte, en une structure unique comme une sorte de recombinaison génétique entre deux molécules circulaires. La libération de l'ADN viral, c'est-à-dire le retour de l'épisome à l'état autonome, serait effectué par l'opération inverse qui redonnerait naissance à deux molécules circulaires d'ADN. Ce schéma permet de rendre compte des principales observations faites, d'une part sur la lysogénéisation et la production de phages par les bactéries lysogènes, d'autre part sur la structure des particules transductrices où un fragment de l'ADN du phage est remplacé par la région gal ou la région bio de l'ADN bactérien.

De nombreux arguments expérimentaux montrent que l'ADN bactérien est bien une structure circulaire. L'ADN du phage, au contraire, est linéaire dans les particules infectieuses. L'analyse génétique du prophage donne une carte différente de celle trouvée au phage végétatif. Mais l'une des deux cartes peut être déduite de l'autre par permutation circulaire. On sait de plus, grâce à l'analyse physico-chimique, que l'ADN linéaire du phage lambda peut être transformé en molécule fermée circulaire par la réunion des extrémités dites « cohésives », suivie de l'action d'une polynucléotide ligase. On a même pu isoler des molécules d'ADN circulaires, soit après infection de bactéries sensibles, par du phage, soit après induction de bactéries lysogènes. Mais on ignore encore le rôle exact de ces molécules circulaires dans la réplication de l'ADN du phage. L'ensemble de ces résultats montre bien que l'ADN du phage peut être converti *in vitro* en structure circulaire et qu'une fraction au moins de cet ADN existe *in vivo* sous forme circulaire. Mais si cette forme existe certainement, comme le demande le schéma d'intégration, il n'y a encore aucun argument direct pour permettre de dire qu'elle représente bien un intermédiaire nécessaire à la lysogénéisation.

On ne sait que peu de choses encore sur les structures qui, dans l'ADN du phage et celui de la bactérie, sont censées s'apparier. Dans l'une et l'autre structure, sont connues des délétions qui suppriment la possibilité d'une lysogénéisation. La délétion du phage lambda, désignée sous le nom de b_2 , représente 15 à 18 % de l'ADN total. Longtemps considérée comme génétiquement silencieuse, la région b_2 semble déterminer la structure de cinq ou six protéines différentes. Elle paraît couvrir partiellement, mais non totalement, le segment qui permet au phage de reconnaître le site d'attachement du prophage lambda sur le chromosome. Il y a des arguments pour suggérer que cette reconnaissance entre les deux ADN découle, non pas d'un appariement spécifique, mais des propriétés de l'enzyme spécifique qui effectue la recombinaison génétique menant à l'intégration.

Dans le schéma d'intégration proposé, il y a plusieurs étapes dans lesquelles doit intervenir quelque système enzymatique :

1. Si l'ADN linéaire du phage peut se transformer spontanément en structure fermée par des liaisons hydrogènes qui réunissent les « extrémités cohésives », il faut un enzyme pour réaliser la fermeture de la molécule par des liaisons covalentes.

2. Il faut un système enzymatique pour effectuer une recombinaison génétique entre l'ADN du phage et celui de la bactérie.

3. Il faut un système enzymatique (qui peut ou non être le même que celui de l'étape 2) pour réaliser l'opération inverse et exciser l'ADN du phage hors de l'ADN bactérien.

4. Une fois l'ADN du phage excisé sous forme de cercle, il faut un système pour l'ouvrir de manière à produire la molécule linéaire à bouts cohésifs que l'on trouve dans la particule infectieuse.

Ceci représente le nombre minimum des étapes dans lesquelles doit intervenir un système enzymatique ; d'autres existent peut-être. Les enzymes en question peuvent être génétiquement déterminés soit par la bactérie, soit par le phage.

L'étape 1 semble effectuée par la polynucléotide ligase de la bactérie. Cet enzyme réalise en effet *in vitro* la fermeture covalente de l'ADN du phage et l'on ne trouve aucun changement d'activité après infection par le phage lambda.

L'étape 4 est très mal connue. Selon toute vraisemblance, elle intervient lors de l'incorporation de l'ADN dans la tête du phage. Certaines expériences démontrent l'existence d'un tel système, désigné sous le nom de *ter* ; mais aucun mutant spécifique ayant perdu l'activité *ter* n'a encore été obtenu.

Quant aux étapes 2 et 3, elles sont réalisées par un, ou plusieurs systèmes enzymatiques déterminés, non par la bactérie, mais par le phage. On sait en effet que des bactéries incapables de se recombiner par suite d'une mutation (*rec*⁻) sont lysogénisées normalement par le phage lambda. Elles ne produisent pas de particules infectieuses après induction par le rayonnement ultraviolet car la mutation *rec* modifie les effets des UV. Cependant, elles sont induites par une élévation de température lorsque le prophage porte une mutation qui rend thermosensible le répresseur du phage. Chez le phage lambda, il existe deux systèmes au moins susceptibles d'intervenir dans la recombinaison génétique au cours de la reproduction végétative.

— Le premier (*red*) réalise des recombinaisons tout au long du chromosome du phage, à l'exception de la région *b*₂ ;

— le second (*int*) réalise des recombinaisons uniquement dans la région *b*₂.

C'est le système *int* qui paraît intervenir aussi bien dans l'intégration du prophage que dans son excision. Certains mutants ont été isolés, qui ont

perdu l'activité *int*. Ces mutants sont devenus incapables de lysogéniser par infection simple, mais seulement par infection mixte grâce à la coopération d'un phage *int*⁺. Le système *int* paraît spécifique, à la fois pour le phage et pour la région homologue du chromosome bactérien car différents types de phages localisés en différents sites du chromosome bactérien possèdent des enzymes *int* différents. Chez les bactéries qui hébergent un prophage porteur d'une mutation *int*⁻, on n'observe pas d'excision après induction. C'est enfin le système *int* qui, après infection par un phage hétéroimmun, permet l'expulsion du prophage hors du chromosome bactérien et la « guérison » de la bactérie. Sans aucun doute, le système *int* joue un rôle essentiel dans l'intégration du prophage comme dans son excision. On ne connaît pas encore le, ou les, enzymes en jeu.

On possède beaucoup moins de renseignements encore sur l'intégration du facteur sexuel F. Récemment, l'ADN du facteur F a pu être isolé sous forme circulaire grâce aux effets du bromure d'éthidium sur la densité des structures circulaires. L'analyse génétique montre que, comme pour le prophage, l'intégration du facteur F chez les bactéries Hfr s'effectue par l'insertion de l'ADN de F dans la continuité de l'ADN bactérien. Toutes les données actuelles sont compatibles avec l'idée d'une intégration provoquée par un seul événement de recombinaison entre deux structures circulaires, l'ADN de F et celui du chromosome bactérien. On ignore encore, aussi bien le mécanisme par quoi se reconnaissent ces deux structures, que les enzymes en jeu.

Pour le moment, le schéma de l'intégration des épisomes par une recombinaison spécifique entre deux molécules circulaires d'ADN donne une description satisfaisante des faits connus. Ce qui apparaît le plus surprenant, c'est la complexité des systèmes sélectionnés par l'évolution pour assurer la précision et la spécificité d'insertion dans un site du chromosome bactérien.

SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires consacrés à certains aspects des épisomes.

M. G. BUTTIN, sous-directeur au Collège de France, a donné trois séminaires ayant trait à : quelques aspects enzymatiques des processus de recombinaison génétique ; l'influence de l'induction des prophages sur l'activité des gènes bactériens voisins ; et les épisomes non bactériens.

M. J. HURWITZ, professeur à l'Université Albert Einstein à New York, a donné deux séminaires où il a discuté de la transcription du bactériophage lambda et de la structure des bactériophages tempérés chez *B. subtilis*.

M. W. GILBERT, professeur à l'Université de Harvard, a donné deux séminaires sur la répllication du phage lambda et sur celle du phage ϕ X.

M. Y. HIROTA, maître de recherche au C.N.R.S., a donné deux séminaires sur les facteurs transmissibles de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries.

ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

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

Mécanismes gouvernant la régulation des synthèses protéiques

L'analyse des systèmes gouvernant la biosynthèse et la dégradation de la proline par *E.coli* a été poursuivie. Dans la voie de biosynthèse, un nouveau type de mutation a été isolé. Contrairement à celles qui modifient l'un des gènes de structures et ne semblent inactiver qu'une seule des étapes enzymatiques, ces mutations paraissent abolir toutes les activités repérables dans la voie de biosynthèse. Il pourrait donc exister dans la biosynthèse de la proline un élément positif stimulant la synthèse des différents enzymes et comparable à ce qui paraît intervenir dans certaines chaînes de dégradation de l'arabinose et du maltose notamment. En outre, lors de la recherche de mutants incapables de synthétiser la proline, est apparue une autre mutation aux propriétés inattendues : ces mutants sont, non seulement modifiés dans la chaîne de biosynthèse, mais constitutifs pour la chaîne de dégradation. Génétiquement, la, ou les mutations ne sont pas localisées dans les gènes de structure gouvernant la voie de biosynthèse. Les propriétés de ces mutants suggèrent l'existence d'un couplage entre la régulation de la voie de biosynthèse et celle de la voie de dégradation (Hubert Condamine).

L'analyse génétique de la fermentation du maltose par *E.coli* a été dirigée principalement sur la région A (mal A). Cette région comprend deux gènes gouvernant la structure de l'amylomaltase (Q) et de la phosphorylase (P), et un autre gène (T) nécessaire à l'expression des deux premiers. Une série de délétions et de mutations ponctuelles suppressibles, de type *ambre*, a été isolée et étudiée. Il ressort de cette analyse que le gène T, à fonction apparemment régulatrice, produit bien une protéine agissant en *trans* dans les souches diploïdes, mais que, contrairement à ce qui était attendu, des quantités relativement importantes de cette protéine sont exigées pour que s'exprime un phénotype normal. De plus, le gène T, quoiqu'adjacent aux gènes de structure, ne fait pas partie de l'opéron constitué par ces derniers (Maurice Hofnung).

L'étude de la DNA-RNA polymérase s'est orientée vers la recherche et la caractérisation de mutations de l'enzyme. Divers mutants ont pu être isolés chez les bactéries sauvages, est considérablement réduite. Or, chez les mutants thermosensibles synthétisant de l'ARN à 30°, mais non à 40°, tout en restant capables de produire à 40° des phages à ARN, mais non à ADN ; d'autre part, mutants résistants à l'antibiotique rifampicine, connu par ailleurs pour son action inhibitrice sur l'enzyme. L'enzyme isolé de certains de ces mutants semble bien être modifié dans sa structure, car il présente des propriétés différentes de celui obtenu à partir du type sauvage. La localisation génétique de ces mutations est en cours. Trois sites au moins, distribués tout autour de la carte génétique d'*E.coli*, semblent participer à l'élaboration de l'enzyme (Charles Babinet).

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

L'analyse a été concentrée sur une série de treize mutants thermosensibles d'*E.coli* capables de synthétiser leur ADN à 30° mais non à 40°. D'après leur localisation sur le chromosome bactérien, on peut répartir ces mutants en deux groupes principaux : le groupe A, localisé près des déterminants génétiques gouvernant la biosynthèse de l'isoleucine et de la valine ; le groupe B, près d'un déterminant de la sensibilité au rayonnement ultraviolet (UVA). L'étude physiologique de ces mutants indique que les groupes A et B correspondent à des fonctions différentes qui semblent intervenir, respectivement, dans les réactions mettant en route un cycle de synthèse d'ADN et dans cette synthèse elle-même. Chez certains mutants du groupe B, la pression osmotique du milieu joue un rôle considérable dans l'expression du phénotype : à 42°, la synthèse d'ADN s'effectue presque normalement lorsqu'on élève la pression osmotique par la concentration de sel. Chez certains de ces mutants, la lésion primaire semble résider, non pas dans les enzymes qui assurent la synthèse d'ADN, mais dans la membrane cellulaire, car ces bactéries semblent plus sensibles à l'action de certains détergents et plus perméables à de petites molécules que le type sauvage. C'est bien ce que laisse prévoir l'hypothèse déjà formulée il y a quelques années, selon laquelle la membrane jouerait un rôle important dans la synthèse de l'ADN et dans la coordination de cette synthèse avec la division cellulaire (Y. Hirota, A. Fritsch, M. Ricard).

Jusqu'à présent, aucune modification biochimique n'avait pu être liée à en directions opposées, donc sur les chaînes d'ADN opposées, à partir d'une binaison génétique et la réparation de certaines lésions de l'ADN, provoquées par exemple par le rayonnement ultraviolet. Récemment, l'analyse de certains mutants thermosensibles a révélé la nature de la lésion entraînée par les mutations du gène *RecB*. Ce gène détermine une fonction impliquée dans la recombinaison génétique et ses mutations entraînent une sensibilité accrue

aux rayonnements X ou ultraviolet, ou à la mitomycine C. Chez les mutants *Rec_B*, la dégradation de l'ADN, que l'on observe dans certaines conditions chez les bactéries sauvages, est considérablement réduite. Or, chez les mutants *Rec_B* est absente une activité désoxyribonucléasique due à un enzyme dont l'activité sur l'ADN natif n'est décelable qu'en présence d'un nucléoside-diphosphate ou triphosphate. Les propriétés de cet enzyme suggèrent pour la première fois l'existence d'un mécanisme gouvernant la régulation de la recombinaison génétique et des réparations de l'ADN en fonction du métabolisme cellulaire (G. Buttin et M. Wright).

Analyse génétique et physiologique du bactériophage

Chez le phage lambda, le répresseur produit par le gène C_I gouverne directement l'expression de deux opérons placés de part et d'autre de C_I . L'un situé à gauche de C_I contient au moins le gène N ; l'autre situé à droite contient le segment $XC_{II}OP$. Il est apparu récemment dans l'étude de certains mutants que le gène C_I n'est plus exprimé quand fonctionne l'opéron XOP. Tout se passe comme si les deux transcriptions ne pouvaient s'effectuer simultanément. Or, le gène C_I et l'opéron XOP, qui sont adjacents, sont transcrits en directions opposées, donc sur les chaînes d'ADN opposées, à partir d'une origine commune. L'analyse génétique de la région $C_I X$ montre un chevauchement apparent entre les deux unités de transcription dans la région de leurs promoteurs. L'ensemble de ces résultats pourraient s'expliquer par l'hypothèse d'une affinité différente des deux promoteurs pour la RNA-polymérase. Si le promoteur de l'opéron XOP avait une affinité supérieure pour l'enzyme, c'est l'opéron XOP qui serait transcrit en l'absence de répresseur. La présence du répresseur bloquant l'accès de la polymérase au promoteur XOP, c'est alors le gène C_I qui serait transcrit. Quoiqu'il en soit, ce système d'expression alternative de deux opérons qui semblent se chevaucher et sont transcrits en directions opposées offre un modèle particulièrement intéressant pour les phénomènes de différenciation cellulaire (P. Brachet, H. Eisen et A. Rambach).

Recherche d'un organisme permettant l'analyse génétique de la différenciation cellulaire et de la morphogénèse

Jusqu'ici, la biologie moléculaire s'est attachée principalement à analyser le matériel cellulaire le plus simple, à savoir la cellule bactérienne, que certaines découvertes avaient rendue accessible à une telle étude. En quelques années, l'élucidation de la structure de principales macromolécules biologiques, protéines et acides nucléiques, l'interprétation de leurs fonctions en termes de structure, la reconnaissance de leurs voies de biosynthèse et de leurs régulations, ont renouvelé notre connaissance de l'hérédité et des mécanismes cellulaires. Aujourd'hui, un organisme apparaît comme l'exécution dans le temps et dans l'espace d'un programme inscrit dans l'ADN. Pour

comprendre les phénomènes de différenciation et de morphogénèse par quoi s'élabore un organisme multicellulaire à partir d'un oeuf, il faut donc comprendre le langage du système logique qui détermine l'émergence de lignées cellulaires différenciées et leurs interactions. Pour cela, il faut tenter d'analyser les circuits régulateurs qui déterminent quand et où sont transcrits les divers segments du message génétique.

Il importe donc de mettre en route une étude génétique du développement et de la différenciation. C'est la simplicité de l'analyse génétique qui, chez les bactéries, a permis de reconnaître les réseaux régulateurs et d'en préciser les éléments. Ce type de recherche considère l'organisme, ou la cellule, comme une « boîte noire » dont elle tente de désorganiser par mutations les rouages inconnus afin d'en analyser le fonctionnement et d'en identifier les constituants. C'est l'une des méthodes les plus puissantes pour démontrer l'existence de composants rares, présents en petite quantité, et pour en étudier la fonction dans les réseaux de régulation.

Le problème qui surgit alors consiste dans le choix d'un organisme. Dans l'état actuel des choses, c'est là une question fort délicate. La bactérie représente 1 cellule, un nématode ou un rotifère 10^3 , une mouche de l'ordre de 10^7 ou 10^8 , une jeune souris plus de 10^{10} , c'est-à-dire près de l'infini pour l'expérimentateur. Entre cette infinité de cellules qui forment un mammifère, même petit, et une bactérie, il devrait y avoir place pour un organisme de complexité réduite. Mais on cherche un organisme accessible, non seulement aux méthodes de la génétique, mais aussi à celles de la biochimie, de la physiologie, de l'embryologie, etc. Et si l'on fait la liste de toutes ces exigences, on ne trouve aucun organisme pour les satisfaire toutes !

On a entrepris l'analyse génétique d'un organisme assez simple, un Nématode, *Caenorhabditis elegans*, qui a déjà été cultivé au laboratoire depuis la fin du XIX^e siècle, et qui est l'objet d'études physiologiques et embryologiques à Lyon, dans le laboratoire de M. Nigon. A Cambridge, M. S. Brenner a entrepris une étude génétique de ce même animal. Il s'agit d'un organisme hermaphrodite, qui se multiplie sur des boîtes de géloseensemencées avec *E.coli*. En trois à quatre jours, cet animal produit quelques 2 à 300 oeufs, qui à leur tour produisent chacun quelque 2 à 300 oeufs. En une dizaine de jours se forme donc un clone de 10^4 animaux ou plus. Ces animaux hermaphrodites ont 2×6 chromosomes. Par perte d'un chromosome X apparaissent des mâles, qui peuvent copuler avec les hermaphrodites et produire des hybrides. Cet organisme se prête donc particulièrement bien à l'analyse génétique. Toutefois, pour des raisons techniques, les études physiologiques et embryologiques y rencontrent beaucoup de difficultés. Des animaux adultes ont été traités par l'éthyl-méthane sulfonate, connu pour son effet mutagène puissant. Toute une série de mutants a été récoltée où se trouvent modifiés la forme, la démarche, la symétrie de plan, le système musculaire, la coordination nerveuse, etc. Ces mutants sont en cours de caractérisation (F. Jacob, A. Ryter, F. de Vitry).

PUBLICATIONS

A. ULLMAN, F. JACOB et J. MONOD, *On the subunit structure of wild-type versus complemented β -galactosidase of Escherichia coli* (J. Mol. Biol., 1968, 32, p. 1-13).

L. H. PEREIRA DA SILVA, H. EISEN et F. JACOB, *Sur la répllication du bactériophage λ* (C. R. Acad. Sci., 1968, 266, p. 926-928).

H. EISEN, L. H. PEREIRA DA SILVA et F. JACOB, *Sur la régulation précoce du bactériophage λ* (C. R. Acad. Sci., 1968, 266, p. 1176-1178).

Y. HIROTA, F. JACOB, A. RYTER, G. BUTTIN et T. NAKAI, *On the processus of cellular division in E.coli. I. Asymetrical cell division and production of DNA-less bacteria* (J. Mol. Biol., 1968, 35, p. 175-192).

L. H. PEREIRA DA SILVA et F. JACOB, *Etude génétique d'une mutation modifiant la sensibilité à l'immunité chez le bactériophage λ* (Ann. Inst. Pasteur, 1968, 115, p. 145-148).

J. DAVIES et F. JACOB, *Genetic mapping of the regulator and operator genes of the lac operon* (J. Mol. Biol., 1968, 36, p. 413-417).

P. CLAVERIE, M. HOFNUNG, et J. MONOD, *Sur certaines implications de l'hypothèse d'une équivalence stricte entre les protomères des protéines oligomériques* (C. R. Acad. Sci., 1968, 266, p. 1616-1618).

C. BABINET et H. CONDAMINE, *Mutants résistants à la rifampicine, modifiés dans leur DNA-RNA-polymérase* (C. R. Acad. Sci., 1968, 267, p. 231-232).

J. A. SHAPIRO, *Mutations caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of E.coli* (J. Mol. Biol., 1968, 40, p. 93-106).

G. BUTTIN, *Les systèmes enzymatiques inductibles du métabolisme des oses chez Escherichia coli* (Adv. Enzymol., 1968, 30, p. 82-111).