

## Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Le cours de cette année a été consacré aux problèmes de la division cellulaire chez les bactéries. On a rappelé tout d'abord l'hypothèse dite du réplicon, formulée il y a quelques années pour expliquer la régulation de synthèse du DNA et la coordination de cette synthèse avec la division cellulaire. Cette hypothèse repose sur les propositions suivantes : 1) les unités de réplication dont est constitué l'équipement génétique des bactéries contiennent chacune des gènes qui gouvernent spécifiquement la régulation de leur propre réplication ; 2) chacune de ces unités est attachée à la membrane dans laquelle s'effectue la synthèse du DNA ; 3) une fois le DNA répliqué, les deux copies sont séparées et réparties dans ce qui deviendra les deux bactéries filles par une synthèse de la membrane entre les points d'attachement de ces deux copies. Toutes ces propositions se prêtent à des vérifications expérimentales. C'est la discussion de ces expériences qui a formé l'objet du cours.

1) L'attachement des unités génétiques à la membrane peut tout d'abord être recherché directement par examen des bactéries au microscope électronique. Sur des coupes de *B.subtilis* en croissance, on constate que, dans chaque bactérie, le DNA est uni, non pas directement à la membrane, mais à une ou deux structures, appelées mésosomes, formées par invagination de la membrane. Par plasmolyse, les mésosomes sont expulsés hors de la cellule. Mais la liaison du DNA au mésosome est suffisamment forte pour que celui-ci, après expulsion du mésosome, apparaisse lié directement à la membrane cellulaire. Il en est de même dans les protoplastes de *B.subtilis*. Au cours du cycle de division, le noyau bactérien d'abord petit semble attaché à un seul mésosome. A mesure qu'il grossit, il devient lié à deux de ces structures dont les bases, près de la membrane, paraissent de plus en plus éloignées. Chez *E.coli*, on n'observe pas de mésosomes, mais des filaments très fins qui paraissent unir membrane et DNA. Dans les sphéropastes, le DNA paraît directement lié à la membrane de la cellule.

L'analyse biochimique met également en évidence l'existence d'une relation entre DNA et membrane. Après incorporation très brève de thymidine radioactive par des bactéries en croissance, rupture des bactéries et centrifugation, la radioactivité se trouve dans la fraction membranaire. Mais la radioactivité est chassée de cette fraction si, après la thymidine tritiée, on donne pendant quelques minutes de la thymidine non-radioactive. Ces résultats obtenus dans divers laboratoires sur des cultures synchronisées suggèrent que la fourche de réplication est bien située dans la membrane.

L'analyse génétique indique aussi une liaison entre DNA et membrane chez *B.subtilis*. On peut en effet préparer des extraits dans lesquels une partie du DNA seulement reste lié à la membrane. Dans ces conditions, Sueoka a constaté que ce DNA était quelque peu enrichi en certains marqueurs génétiques, ceux qui sont déjà connus pour être situés au « début » du chromosome de *B.subtilis*.

La situation peut donc se résumer de la façon suivante. Conformément à l'hypothèse du réplicon, l'étude morphologique met en évidence l'existence d'une liaison entre DNA et membrane. L'analyse avec des isotopes radioactifs montre que la fourche de réplication participe à cette liaison. La génétique indique elle que l'origine de réplication pourrait bien être attachée à la membrane. Résultats qui ne s'excluent pas mais qui, s'ils sont confirmés, conduisent à une représentation assez complexe de la zone d'attachement.

2) La manière dont s'allonge la membrane bactérienne est encore mal connue. Il est relativement aisé de « marquer » spécifiquement la surface de la bactérie, c'est-à-dire la couche externe de la paroi, à l'aide d'anticorps fluorescents, de bactériophages, etc. On obtient alors des résultats fort différents selon les espèces de bactéries. Avec la plupart des Gram-positifs, des fragments importants de la structure sont transmis intacts à travers les générations successives : la synthèse paraît donc se faire, non pas de manière diffuse tout au long de la surface, mais en un petit nombre de zones bien localisées et notamment à l'équateur de la bactérie. Chez les Gram-négatifs, au contraire, les repères de surface sont progressivement dilués au cours de la croissance : la synthèse de la structure doit donc s'effectuer de manière diffuse tout au long de la bactérie.

Il est beaucoup plus difficile de marquer les couches internes de la paroi et surtout la membrane cellulaire de manière spécifique. On peut tenter de marquer les phospholipides à l'aide de radioisotopes, soit avec du glycérol radioactif, soit avec un acide gras chez des mutants convenables, puis d'étudier par autoradiographie la manière dont la radioactivité incorporée se distribue dans la descendance. On peut aussi utiliser un système de perméase spécifique et inductible, tel celui des  $\beta$ -galactosides chez *E.coli*, pour rechercher comment, après induction, ce système se répartit entre bactéries filles à chaque géné-

ration. Mais dans les deux cas, on se trouve confronté à des difficultés techniques difficiles à surmonter ; et les résultats obtenus jusqu'ici se trouvent en totale contradiction.

Il y a cependant deux types d'expériences qui ont apporté des renseignements plus précis. L'un, dû à Schwartz et son groupe, consiste à étudier l'effet de la pénicilline sur la structure de la muréine qui forme la couche interne de la paroi chez *E.coli*. On constate aussi que la synthèse de la muréine s'effectue par deux mécanismes distincts. L'un diffus, sensible aux fortes, mais non aux faibles concentrations de pénicilline, intervient dans l'élongation de la cellule. L'autre localisé au centre, sensible aux faibles concentrations de pénicilline, permet la formation du septum entre les deux chromosomes et la division.

La seconde méthode, due à A. Ryter, met en jeu un mutant de *B.subtilis* chez lequel la formation des flagelles est thermosensible. Chez cet organisme, les flagelles se raccordent à la membrane à travers la paroi et peuvent donc servir de repères pour la membrane cellulaire. Avec le mutant, les flagelles se forment normalement quand la croissance a lieu à 30°, mais non à 40°. Toutefois, ceux qui sont déjà formés à 30° persistent à 40°. On peut donc rechercher la manière dont ils se distribuent dans la descendance. Ce qu'on observe alors, c'est que les flagelles ne se transmettent pas de manière diffuse à la descendance, mais restent groupés à chaque extrémité de la chaîne formée par la croissance. Les deux types d'expérience, avec la muréine et avec les flagelles, mettent donc en évidence un processus de synthèse localisé dans la région médiane de la cellule bactérienne.

3) Les mécanismes qui opèrent dans la synthèse du DNA sont encore mal connus. Il semble bien que cette synthèse démarre toujours en un même point, ou origine, que l'on parvient à localiser avec plus ou moins de précision par différentes méthodes ; puis qu'elle procède dans une seule direction, celle des aiguilles d'une montre. En milieu simple, un nouveau cycle de synthèse ne peut recommencer avant que le précédent soit terminé. En milieu complet au contraire, où le temps de génération est 2 ou 3 fois plus court, deux cycles de synthèse s'amorcent successivement pendant chaque cycle de division. En outre, différents types d'expérience montrent que la mise en route d'un cycle de synthèse de DNA exige la synthèse d'une protéine au moment de cette mise en route et d'une autre quelques minutes plus tôt. On peut donc se représenter la réplication du DNA bactérien comme formé d'au moins deux opérations bien distinctes : le démarrage de la synthèse et l'élongation des chaînes. C'est la première qui est la réaction de régulation, couplée avec la division cellulaire comme le montrent diverses expériences. La seconde au contraire n'est qu'une réaction « aveugle » par quoi se réplique fidèlement toute séquence de nucléotides offerte comme matrice. Mais aussi

simple que puisse apparaître cette seconde réaction, on n'en connaît pas encore les enzymes. Le mutant isolé il y a quelques mois par Cairns et dépourvu de la DNA-polymérase décrite par Kornberg, se multiplie à peu près normalement. De nombreux laboratoires cherchent maintenant à isoler la véritable « réplicase », de préférence à partir de fractions membranaires de bactéries.

Divers mutants thermosensibles ont été isolés chez lesquels est inhibée la synthèse de DNA, mais non celle de RNA et de protéine. Chez certains de ces mutants, c'est le démarrage de la réplication qui ne peut s'effectuer à haute température ; chez d'autres, le processus d'élongation. Pour plusieurs de ces mutants, on a pu mettre en évidence, directement ou indirectement, des lésions de la membrane cellulaire. Il est inutile de souligner l'intérêt que peut présenter l'analyse de ces mutants pour comprendre la division cellulaire, la synthèse et la répartition du DNA.

#### SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires consacrés à certains aspects de la division cellulaire et de la synthèse du DNA.

M<sup>me</sup> Antoinette RYTER, maître de recherche au C.N.R.S., a donné deux séminaires sur la membrane bactérienne, la structure et fonction des mésosomes ainsi que sur la morphologie des relations entre DNA et membrane.

M. Immo SCHEFFLER, professeur à l'Université de Californie à San Diego, a discuté, dans un séminaire, le mécanisme de la réplication et les enzymes en jeu chez les bactéries.

M. Luis PEREIRA DA SILVA, maître de recherche au C.N.R.S., a exposé les connaissances actuelles sur la réplication du bactériophage  $\lambda$ .

M. Michael YARMOLINSKY, chef de service au National Institute of Health de Bethesda, a discuté des facteurs bactériens intervenant dans la réplication de certains bactériophages.

M. François CUZIN, chargé de recherche au C.N.R.S., a donné trois séminaires : un sur les propriétés génétiques du facteur sexuel chez *E.coli* ; et deux sur le cycle de division chez les cellules de mammifères ainsi que sur le phénomène connu sous le nom « d'inhibition de contact ».

M. Maxime SCHWARTZ, chargé de recherche au C.N.R.S., a étudié le processus de mise en route de synthèse du DNA chez *E.coli*.

## ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

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

### I. CELLULE BACTERIENNE

#### A) Mécanismes gouvernant la synthèse du DNA et coordonnant la division cellulaire

Deux types de mutants thermosensibles d'*E.coli* ont été analysés. Dans le premier type (Dna-A), les bactéries sont capables, à haute température, de terminer un cycle de synthèse de DNA déjà commencé à basse température, mais non d'en mettre en route un nouveau. Les mutations correspondantes sont localisées dans la région Ilv-PyrE du chromosome. Elles paraissent liées à une modification de membrane.

Dans le second type, la synthèse de DNA s'arrête aussitôt après transfert à haute température. Les mutations, liées à la région MalB, semblent empêcher l'élongation de chaînes en voie de réplication.

Dans des mutants de ces deux types, on a introduit, par croisement, la mutation Pol A<sup>-</sup>, isolée par Cairns et qui réduit de 99 % l'activité de la DNA polymérase. Il est possible alors chez ces doubles mutants, d'exposer les bactéries à l'action du toluène puis de mesurer l'activité de la « réplicase » par incorporation de dXTP radioactifs. Les propriétés trouvées à ces préparations s'accordent aux phénotypes de chaque catégorie de mutants. Grâce à ces préparations, il devient possible d'analyser les facteurs en jeu dans la réplication du chromosome bactérien.

Le modèle du réplicon suggère que certaines mutations qui empêchent le démarrage d'un cycle de synthèse sur le chromosome pourrait, sous certaines conditions, être supprimées par intégration d'un autre réplicon. C'est ce qui a été vérifié avec le facteur sexuel F et avec le phage P2. Le mécanisme de cette suppression est en cours d'analyse.

Dans une autre série de mutants thermosensibles, récemment isolés chez *E.coli*, on n'observe à haute température ni division cellulaire, ni formation d'un septum. Les bactéries n'en poursuivent pas moins leur synthèse de protéine, de RNA et de DNA. La manière dont se comportent les filaments formés à 40° après retour à 30° permet de distinguer plusieurs classes de mutations. L'analyse génétique et biochimique de celles-ci est en cours (Y. Hirota, M. Ricard, J. Mordoh et A. Fritsch).

Dans l'hypothèse du réplicon, c'est la synthèse de la membrane cytoplasmique en des sites localisés qui sépare les copies du DNA formées par répllication et leur distribution dans les bactéries filles. La mise à l'épreuve de cette prédiction exige un marquage spécifique de la membrane. Difficile à réaliser directement avec des composés radioactifs, ce marquage ne peut encore se faire qu'indirectement par l'intermédiaire de certaines structures. La question a pu être abordée grâce à un mutant thermosensible de *B. subtilis* chez lequel les flagelles sont synthétisés à 30° et non à 40°. On peut ainsi étudier comment ces organites produits à 30° se distribuent dans la descendance au cours de la croissance à 40°. On constate ainsi que, conformément aux prédictions, les flagelles ne se retrouvent pas uniformément dans la descendance, mais restent liés à certaines régions de certaines cellules (A. Ryter, C. Fréhel).

L'analyse de la nucléase gouvernée par le gène *RecB*<sup>-</sup> a été poursuivie. L'enzyme a été purifié et ses propriétés étudiées. Selon la nature du polymère qui lui est donné comme substrat, on peut distinguer plusieurs types d'activités enzymatiques (M. Wright).

#### B) Régulation de la synthèse des protéines

Dans l'analyse du système permettant la fermentation du maltose chez *E. coli*, l'étude de la région *malA* a été poursuivie grâce à l'isolement de mutants nouveaux. Chez ceux-ci, l'opéron *malP* — *malQ* est exprimé même en l'absence du gène *malT*, enlevé par délétion. Les mutations correspondantes (*malI<sub>A</sub>*<sup>c</sup>) sont situées entre les gènes *malT* et *malP*. Elles entraînent une expression constitutive de l'opéron *malP* — *malQ* en *cis*. L'introduction d'un allèle *malT*<sup>+</sup>, en *cis* ou en *trans* par rapport à ces mutations, a les conséquences suivantes :

— en l'absence d'inducteur (maltose), on n'observe pas de modification dans l'expression constitutive de l'opéron,

— en présence d'inducteur, la synthèse des deux protéines régies par l'opéron est accrue dans 30 % des mutants.

Les propriétés des mutations *malI<sub>A</sub>*<sup>c</sup> viennent donc renforcer l'hypothèse selon laquelle le produit du gène *malT* joue un rôle de régulation positive dans l'expression de l'opéron *malA*. Elles montrent que contrairement à ce qui se passe dans l'utilisation de l'arabinose — où le gène *araC* semble avoir une fonction de régulation tantôt négative, tantôt positive — le gène *malT* n'exerce d'action que positive. Les mutations *malI<sub>A</sub>*<sup>c</sup> pourraient correspondre soit à une modification du promoteur de l'opéron *malP* — *malQ* (mutants surinductibles), soit à l'insertion d'un nouveau promoteur entre *malT* et *malP* (mutants non surinductibles) (M. Hofnung).

L'analyse génétique et biochimique de la DNA-RNA polymérase s'est poursuivie notamment grâce à l'étude de mutants sensibles à la température, ou résistants à la rifampicine. Parmi ces derniers, certains se présentent comme dominants, d'autres comme récessifs par rapport à l'allèle sauvage chez les bactéries diploïdes pour le segment correspondant du chromosome (C. Babinet).

## II. CELLULES DE MAMMIFERES

### A) Propriétés des cellules de mammifères

L'étude des cellules de neuroblastome a été poursuivie. Il s'agit d'une lignée établie en culture dont les cellules se multiplient rapidement sous forme de petites sphères dans certaines conditions. Dans d'autres au contraire, les cellules s'attachent sur le fond des boîtes de culture et se « différencient » en cellules qui, morphologiquement et physiologiquement, ressemblent à des neurones. Les deux types diffèrent par leurs caractères de coloration, par la présence de microtubules, par le nombre de chromosomes et par la gamme des protéines qu'elles synthétisent. On a cherché à analyser les facteurs qui interviennent dans cette différenciation et plus particulièrement l'effet du 5-bromo déoxyuridine (5-BrdU) et de la concentration en sérum.

A des concentrations comprises entre  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$ M, le 5-BrdU induit une différenciation dans l'ensemble d'une population, que les cellules soient ou non capables de se multiplier. Cet effet qui exige une synthèse de protéines se manifeste même en l'absence de synthèse de DNA. Ce n'est donc pas par incorporation dans le DNA qu'agit l'analogue. Celui-ci entraîne une perturbation du métabolisme cellulaire qui induit secondairement la différenciation. Selon toute vraisemblance, le 5-BrdU agit en perturbant la surface de cellule, donc son interaction avec la surface des boîtes de culture. C'est à la même conclusion que conduit l'étude de la concentration en sérum sur la différenciation. En l'absence de sérum, les cellules s'aplatissent, s'attachent au fond de la boîte et se différencient rapidement, mais réversiblement. De faibles concentrations de sérum, dialysé ou non, ou de certaines protéines, empêchent les cellules de s'étaler et de se différencier. Certains produits du métabolisme cellulaire, et notamment l'acide lactique, favorisent au contraire l'attachement et la différenciation. De tous ces phénomènes, le seul point commun paraît être en effet sur la membrane cellulaire et son interaction avec le fond de la boîte. C'est donc par l'intermédiaire d'une réaction de surface que seraient modifiées les activités, donc le phénotype, de la cellule (F. Jacob, D. Schubert, F. de Vitry).

Parallèlement, on a commencé à rechercher des mutants thermosensibles, c'est-à-dire des cellules capables de former des colonies à basse mais non à haute température. Le matériel choisi est constitué par des lignées stabi-

lisées de cellules provenant du poumon de hamster chinois (*Crietulus griseus*). Le choix de ce matériel a été dicté par deux propriétés. La première est la formule caryotypique du hamster chinois ( $2n = 22$ ) : le nombre relativement faible des chromosomes et leur diversité morphologique permettent de déceler assez facilement des anomalies génétiques importantes (polyploidie, hétéroploidie, perte sélective d'un chromosome, etc.) et peuvent être très avantageux pour un fractionnement ultérieur du stock chromosomique par les techniques de sédimentation de zone. La seconde propriété remarquable de ce matériel est la possibilité qu'il offre d'analyser les dérèglements de la division cellulaire causés par les virus oncogènes, puisque les cellules de hamster en culture peuvent être transformées par le virus du polyome.

Pour l'isolement de cellules mutantes, diverses techniques de sélection ont été employées sur des populations préalablement traitées par un agent mutagène tel que l'éthylméthane-sulfonate ou la nitrosoguanidine. Plusieurs clones qui avaient résisté à une incubation prolongée à 39° en présence de l'agent carcinostatique cytosine-arabinozide ont été isolés. La croissance de ces mutants s'est uniformément révélée thermodépendante pour des ensemencements sur boîtes effectués à faible densité cellulaire (environ 1 000 cell./boîte) mais toute déviation de ces conditions expérimentales aboutit soit à une incapacité de croissance à toute température pour des densités d'ensemencement plus faibles, soit au contraire à une absence d'expression décelable de la mutation par des ensemencements plus denses. Ces propriétés limitent de toute évidence les possibilités d'étude génétique ou biochimique des mutants. Une autre sélection a consisté en des cycles alternatifs de culture à 39° en présence de <sup>3</sup>H-thymidine de très forte radioactivité spécifique avec des cycles de culture à 34° en absence de l'isotope : un clone mutant, dont les propriétés de thermosensibilité paraissent s'exprimer dans une gamme assez variée de conditions de culture, a été obtenu et est en cours d'étude (G. Buttin, I. Scheffler).

#### B) *Virus oncogènes*

Ce travail vise à identifier les fonctions précoces exigées pour le développement du virus du polyome dans des fibroblastes de souris infectées. De telles fonctions peuvent correspondre soit à la dérèpression d'un ou plusieurs enzyme(s) cellulaire(s) à la suite de l'infection, soit à l'expression d'une information portée par le génome viral. C'est alors l'étude de cellules infectées par un mutant thermosensible du virus qui devrait permettre un choix entre ces deux hypothèses.

Le problème de l'identification de fonctions nouvelles dans la cellule infectée a été abordé en particulier en comparant les activités endonucléasiques à celles d'un témoin non infecté. Un travail antérieur avait conduit à proposer comme hypothèse de travail l'existence d'une endonucléase spécifique d'infor-



mation virale, capable de réaliser un nombre restreint de coupures sur l'une des chaînes du génome du virus.

La mise en évidence d'une activité de ce type est rendue difficile par la présence dans la cellule, infectée ou non, de plusieurs endonucléases non spécifiques. Pour tourner cette difficulté, on a utilisé les techniques suivantes :

1) fractionnement des cellules et étude des seules protéines nucléaires (le cycle entier du virus ayant lieu dans le noyau) ;

2) préparation d'un antiserum contre les protéines nucléaires de la cellule non infectée ; un sérum de lapin a été obtenu, après injections répétées d'extraits de noyaux de cellules non infectées, qui contient des antigènes contre une série de protéines de ces extraits ; dans le travail en cours, nous étudions les conditions optimales pour retenir sur un gel d'anticorps polymérisés par la glutaraldéhyde (selon la technique mise au point par Avrameas et ses collaborateurs) une partie au moins des protéines cellulaires, de manière à pouvoir reconnaître les protéines nouvelles présentes dans la cellule infectée, soit par leur activité enzymatique, soit par électrophorèse sur gels de polyacrylamides ;

3) étude des activités enzymatiques éventuellement présentes dans les virions, ceux-ci pouvant être obtenus dans un état de pureté satisfaisant.

Des résultats encore préliminaires suggèrent l'existence, dans les noyaux de cellules infectées, d'une endonucléase particulière dont l'activité paraît dépendre de la présence d'un acide ribonucléique. Le même type d'activité a été récemment observé dans des préparations de virions (F. Cuzin, D. Blangy, C. Ebersolt).

#### PUBLICATIONS

M. RICARD, Y. HIROTA et F. JACOB, *Isolement de mutants de membrane chez Escherichia coli* (C. R. Acad. Sci., 1970, 270, p. 2591-2593).

H. EISEN, P. BRACHET, L. H. PEREIRA DA SILVA et F. JACOB, *Regulation of repressor expression in  $\lambda$*  (Proc. Natl. Acad. Sci., 1970, 66, p. 855-862).

F. JACOB et J. MONOD, *Introduction* (In *The lactose operon*, J. R. Beckwith et D. Zipser, éd., Cold Spring Harbor Lab., 1970, p. 1-4).

L. ERON, J. BECKWITH et F. JACOB, *Deletion of translational start signals in the lac operon of E.coli* (In *The lactose operon*, J. R. Beckwith et D. Zipser, éd., Cold Spring Harbor Lab., 1970, p. 353-358).

B. SHAPIRO, A. SICCARDI, Y. HIROTA et F. JACOB, *On the process of cellular division in Escherichia coli. II. Membrane protein alterations associated with mutations affecting the initiation of DNA synthesis* (*J. Mol. Biol.*, 1970, 52, p. 75-89).

Y. HIROTA, J. MORDOH et F. JACOB, *On the process of cellular division in E.coli. III. Thermosensitive mutants of E.coli altered in the process of DNA initiation* (*J. Mol. Biol.*, 1970, 53, p. 369-387).

D. SCHUBERT et F. JACOB, *5-Bromodeoxyuridine-induced differentiation of a neuroblastoma* (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1970, 67, p. 247-254).

J. MORDOH, Y. HIROTA et F. JACOB, *On the process of cellular division in Escherichia coli. V. Incorporation of deoxynucleoside triphosphates by DNA thermosensitive mutants of Escherichia coli also lacking DNA polymerase activity* (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1970, 67, p. 773-778).

P. BRACHET, C. LEURS, P. BARRAND et L. H. PEREIDA DA SILVA, *Sur les mutants réverses des prophages  $\lambda$  défectifs du segment x* (*C. R. Acad. Sci.*, 1970, 270, p. 734-735).

P. BRACHET, H. EISEN et A. RAMBACH, *Mutations of coliphage  $\lambda$  affecting the expression of replicative functions O and P* (*Molec. Gen. Genetics*, 1970, 108, p. 266-276).

G. BUTTIN et G. VOVIS, *An ATP-dependent deoxyribonuclease from Diplococcus pneumoniae. I. Partial purification and some biochemical properties* (*Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 224, p. 29-41).

— *An ATP-dependent deoxyribonuclease from Diplococcus pneumoniae. II. Evidence for its involvement in bacterial recombination* (*Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 224, p. 42-54).

C. BABINET, *A mutation which affects the resistance of E.coli to rifampicine* (In *ler Lepetit Colloquium on RNA-polymerase and transcription*, L. Silvestri, éd., Florence, 1970, p. 37).