

Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Cette année le cours a été consacré à l'intégration virale, c'est-à-dire, aux processus par lesquels le matériel génétique d'un virus devient partie intégrante d'un chromosome cellulaire. On a considéré successivement le cas de certains bactériophages dans les bactéries et celui de certains virus oncogènes dans les cellules de mammifères. Depuis plus de vingt ans, en effet, le bactériophage a servi de modèle pour l'étude du développement viral chez les organismes pluricellulaires. Peu à peu, l'utilisation de cellules en culture, la formation de plages sur une nappe de cellules, la mise en œuvre de techniques variées, tant biochimiques que génétiques, tout cela a conduit à un développement spectaculaire dans l'étude des virus pathogènes pour les plantes et surtout les animaux. Les techniques nouvelles ont permis d'appliquer là les méthodes utilisées jusqu'alors dans l'analyse du bactériophage. Longtemps une bonne part des recherches portant sur les virus des animaux visaient à y retrouver ce qui était déjà connu chez le bactériophage. En même temps sont apparues certaines singularités qui ont fait de l'étude de chaque virus un petit domaine autonome. Pourtant, il existe encore un aspect de l'infection virale où le bactériophage sert encore de modèle pour la pathologie des tissus animaux : c'est celui de l'intégration virale. Tout donne à penser en effet, que dans de nombreux cas de tumeur où une origine virale a été démontrée, il y a une liaison entre le rôle oncogène du virus et le pouvoir qu'a son acide nucléique de s'insérer, sous une forme ou une autre, dans le matériel génétique de la cellule hôte. Mais les techniques de génétique cellulaire utilisées chez les bactéries pour l'analyse de prophage n'ont pas encore d'équivalent chez les cellules de mammifères.

*Chez les bactéries lysogènes, l'ADN viral persiste en harmonie avec le génome bactérien et sa multiplication est coordonnée avec la division cellulaire. Cela peut être réalisé de différentes manières suivant les types de phage. Chez *Escherichia coli*, certains phages, comme λ , s'insèrent dans des condi-*

tions normales pratiquement toujours au même site du chromosome bactérien. D'autres comme P2, s'insèrent en l'un de plusieurs sites possibles. D'autres encore, comme μ paraissent pouvoir s'insérer un peu n'importe où dans ce chromosome. D'autres enfin, comme P1, ne s'insèrent pas dans le chromosome mais se répliquent de manière indépendante du chromosome bactérien, et coordonnée avec la division de la cellule. Certains mutants de λ (N ou dv) peuvent également se répliquer ainsi. Dans la suite de ce cours, on a limité l'analyse aux mécanismes permettant à l'ADN du phage λ de s'insérer au site normal du chromosome bactérien.

Après avoir rappelé la structure, nucléique et protéique, de la particule infectieuse, on a résumé les processus génétique et biochimique qui accompagnent la reproduction du phage λ . La localisation chromosomique du prophage entre les caractères bactériens galactose et biotine, est déduite d'une série d'arguments génétiques. L'insertion linéaire du prophage, dans la continuité du chromosome bactérien a d'abord été mise en évidence par l'étude génétique ; distension de la liaison entre *gal* et *bio* due à la présence du prophage : structure des particules transductrices $\lambda d gal$ ou λbio , position des caractères du prophage par rapport à ceux de la bactérie avec permutation de la carte génétique telle qu'on l'observe au cours de la reproduction végétative du phage ; délétions couvrant à la fois des gènes d'origine bactérienne et virale ; délétions branchant des gènes bactériens sur les systèmes de régulation viraux. Les conclusions relatives à l'insertion de l'ADN viral sont maintenant étayées par des arguments physico-chimiques : allongement de l'ADN observé chez le facteur sexuel F lorsqu'il est porteur d'un prophage ; examen au microscope électronique de doubles chaînes d'ADN reconstituées par l'hybridation d'une chaîne du phage λ sauvage avec la chaîne complémentaire issue d'un mutant porteur d'une délétion ou d'une addition (hétéroduplexe).

L'ensemble de ces résultats s'accorde au modèle proposé naguère par Campbell. Selon ce modèle, les processus d'intégration et d'excision correspondent chacun à un événement — recombinaison entre segments homologues du DNA bactérien et phagique. L'existence de deux enzymes spécifiques jouant un rôle dans ces phénomènes a été démontrée par des moyens génétiques. L'un (*int*) intervient pour l'intégration du prophage aussi bien que pour son excision. L'autre au contraire (*xis*) ne fonctionne que pour l'excision. La synthèse de ces deux enzymes obéit à une régulation délicate. La plus grande stabilité observée chez *int* que chez *xis* explique que, après infection, un DNA phagique puisse s'intégrer sans être aussitôt excisé.

Quant aux sites d'attachement sur l'ADN du phage et sur celui de la bactérie, il est possible d'en étudier la structure grâce à certains variants du phage. D'un côté, en effet, les phages transducteurs portent des sites d'atta-

chement qui ne sont pas identiques à celui du phage sauvage, mais correspondent soit au site bactérien pour $\lambda d gal$, soit à une structure recombinante pour λbio . D'un autre côté, des délétions ont été isolées qui retirent au phage un segment plus ou moins long dans le site d'attachement. Ces structures peuvent être analysées grâce à la formation d'ADN hybrides artificiels (hétéroduplexes), qui permettent de préciser la nature, la longueur et la position des sites d'attachement. De cette étude, il ressort que site bactérien et site phagique ne sont pas identiques. La situation apparaît plus complexe que prévue par le modèle de Campbell.

L'étude des virus oncogènes a été limitée cette année aux deux petits virus à ADN, polyome et SV40. Pour chacun d'eux, la particule infectieuse a une forme sphérique et correspond à un poids moléculaire d'environ 25×10^6 . La capsidie apparaît au microscope électronique comme formée de 72 unités identiques, dont chacune est constituée de 5 ou 6 protéines. A l'analyse, les protéines extraites du virus se révèlent d'une complexité inattendue : un pic principal correspondant à un poids moléculaire de 47 000 représente 70 à 80 % des protéines totales et correspond à la capsidie. A cela s'ajoutent un pic correspondant à un poids moléculaire de 46 000, deux pics de 30 000, deux pics de 25 000 et trois pics qui représentent vraisemblablement des histones cellulaires.

L'ADN a une structure circulaire covalente. Son poids moléculaire est d'environ 3×10^6 , sa densité de $1,709 \text{ g/cm}^3$. Il contient de 4 500 à 5 000 paires de bases, c'est-à-dire, de quoi spécifier 1 500 à 1 800 acides aminés. Dans les préparations d'ADN extraites des virus, la centrifugation en gradient de densité révèle la présence de deux structures : l'une (forme I), plus dense et non dénaturable en gradient alcalin, l'autre (forme II), moins dense et dénaturable en gradient alcalin. Les travaux de Vinograd ont montré que la forme I est une structure fermée de façon covalente sur les deux chaînes et enroulée sur elle-même alors que la forme II circulaire elle aussi, n'est fermée de façon covalente que sur une chaîne et n'est pas enroulée sur elle-même. Une seule coupure sur une chaîne suffit à convertir la forme I en forme II. Certaines préparations d'ADN contiennent en outre une forme III, structure linéaire à double chaîne. Toute une série d'arguments expérimentaux montrent qu'il s'agit là d'un ADN d'origine non pas virale, mais cellulaire, qui a été empaqueté dans les particules de virus au moment de la maturation.

Au cours de l'infection de cellules permissives par l'un des deux virus, la multiplication virale paraît s'opérer de la façon suivante. La particule virale s'attache d'abord à la membrane cellulaire d'où elle est transférée dans le noyau. L'acide nucléique viral libéré est alors transcrit, probablement de façon partielle, par une ADN-ARN polymérase de la cellule pour donner

les messagers dits « précoces ». Ceux-ci sont traduits en protéines précoces comprenant notamment l'antigène nucléaire T et l'antigène de transplantation TSTA. L'ADN viral se réplique alors par un mécanisme encore inconnu qui met en jeu des enzymes cellulaires et selon toute vraisemblance certaines des protéines précoces de virus. Certains segments de l'ADN viral sont alors transcrits en messagers « tardifs ». Celles-ci sont traduites pour donner notamment les protéines de structure du virion. La maturation s'opère alors spontanément pour assembler dans le noyau cellulaire ADN et protéines virales.

L'analyse génétique de ces systèmes est encore réduite. On connaît quelques mutants de SV40 qui diffèrent dans la taille des plages formées sur cellules permissives. Une série de mutants thermosensibles a été isolée notamment chez le virus polyome. Les expériences de complémentation réalisées en infections mixtes permettent de distinguer quatre groupes de mutants. Les groupes 1 et 4 ne perturbent pas la synthèse d'ADN viral ni la synthèse d'ADN cellulaire induite par le virus, ni le pouvoir de transformation ; selon toute vraisemblance ils entraînent une modification de structure dans l'une des protéines de virion. Les mutations du groupe 2 inhibent la synthèse d'ADN viral et la capacité de transformation à température non permissive sans empêcher l'induction de l'ADN cellulaire. Celles du groupe 3 enfin, n'inhibent que la synthèse d'ADN viral. Un autre type de mutant du virus polyome a été isolé, qui ne se multiplie sur les cellules permissives que si celles-ci sont déjà transformées par le polyome ; pour se multiplier, ce mutant paraît exiger l'expression d'une fonction au moins du provirus.

Après avoir résumé les propriétés des cellules transformées ainsi que les conditions de transformation par infection virale, on a décrit les arguments expérimentaux concernant la nature et la localisation des provirus. Qu'une partie au moins du génome viral se perpétue chez les cellules transformées est suggéré par toute une série d'arguments : production des antigènes spécifiques, T et TSTA, présence d'ADN hybridable avec l'ADN viral, propriétés partie au moins du génome viral se perpétue chez les cellules transformées par le polyome, etc... Mais la démonstration que le génome viral persiste dans son entier chez les cellules transformées repose sur la production de virus dans certaines conditions.

Dans le cas du SV40, une production de virus est observée chez les hybrides, formés par fusion entre cellules non permissives transformées et cellules permissives. Dans le cas du polyome, du virus est produit quand les cellules permissives transformées par le mutant thermosensible *ts-a* (groupe 2), cultivées d'abord à température non permissive (38° 5) sont ramenées à température permissive (31°).

Quant à la localisation du génome viral dans la cellule transformée, elle n'est pas encore définitivement établie. On peut rechercher s'il existe dans le noyau ou dans le cytoplasme, des séquences d'ADN capables de s'hybrider spécifiquement avec l'ADN viral. Etant donné l'énorme excès d'ADN cellulaire en regard de l'ADN viral, ce type d'expérience exige des précautions particulières. On constate alors que l'ADN viral, ou une copie ribonucléique formée *in vitro*, est capable de s'hybrider avec l'ADN extrait du noyau cellulaire, ou même des chromosomes, mais non avec celui extrait du cytoplasme. Dans l'ADN nucléaire, on ne trouve de structure ni doublement fermée, ni simplement fermée, ni linéaire qui ait la taille de l'ADN viral. On peut au contraire démontrer que les séquences hybridables avec l'ADN viral sont unies à des séquences d'ADN cellulaire par des liaisons covalentes résistant à l'alcali. Le génome viral semble donc bien inséré dans la continuité de l'ADN cellulaire. C'est ce que confirme l'analyse récente des ARN nucléaires produits par les cellules transformées. Les séquences hybridables avec l'ADN viral se trouvent dans des molécules dont la taille excède de loin celle de l'ADN viral ; les séquences virales y paraissent liées de façon covalente à des séquences cellulaires.

Si le provirus est bien inséré dans le génome viral, il devrait être possible d'en préciser la localisation par des méthodes génétiques. Malheureusement, l'expérimentation génétique reste encore très limitée avec les cellules somatiques. Comme certains hybrides formés par fusion entre deux types cellulaires perdent préférentiellement les chromosomes issus d'un type parental, on peut rechercher une corrélation entre la persistance d'un certain phénotype et celle de certains chromosomes. Dans ce but, les expériences de fusion ont été réalisées entre cellules humaines transformées par le virus SV40 et cellules de souris. Dans ce cas, les hybrides perdent préférentiellement les chromosomes d'origine humaine. On peut donc chercher si la perte du phénotype « transformé », déterminé par la perte de l'antigène nucléaire T, correspond à la perte de certains chromosomes humains. Mais jusqu'à présent, l'imprécision des résultats n'a pas encore permis d'aboutir à des conclusions définitives.

La dernière question examinée porte sur le nombre des provirus présents dans la cellule transformée. En utilisant des méthodes d'hybridation raffinées, on devrait pouvoir estimer le nombre des sites qui dans l'ADN cellulaire peuvent s'hybrider avec un ADN viral. Les premières expériences dans ce sens, faites il y a plusieurs années utilisaient l'ARN formé *in vitro* par copie de l'ADN viral. Le nombre des provirus ainsi estimé était assez élevé, de l'ordre de 20 à 60 par cellule pour le SV40 et de 5 à 10 pour le polyome. Plus récemment, cette question a été reprise par l'analyse de la cinétique de

réassociation en utilisant l'hydroxyapatite. Cette technique beaucoup plus fine conduit à estimer à 1 ou 2 le nombre d'équivalents viraux présents dans chaque cellule transformée par le SV40.

Il semble donc bien que, comme dans le cas du phage chez les bactéries lysogènes, l'ADN des petits virus oncogènes soit présent en un, ou quelques rares exemplaires dans la cellule transformée. Il semble bien que, comme celui du phage, il soit inséré dans la continuité de l'ADN constituant un des chromosomes. Mais on ignore encore s'il n'existe qu'un seul site d'insertion sur un seul chromosome et sur lequel.

SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires consacrés à certains aspects de l'intégration virale.

M. Luiz PEREIRA DA SILVA, maître de recherche au C.N.R.S., a donné un séminaire sur les mécanismes qui procèdent à la régulation du bactériophage lambda, au cours de la multiplication végétative.

M. Michael YARMOLINSKY, maître de recherche au C.N.R.S., a discuté des aspects génétiques de l'intégration et de l'excision chez les bactériophages tempérés.

M. Philippe BRACHET, chargé de recherche à l'Institut Pasteur, a donné deux séminaires, l'un sur la régulation de l'immunité chez le bactériophage lambda, l'autre sur les sites anormaux d'intégration du prophage.

M. François CUZIN, maître de recherche au C.N.R.S., a donné deux séminaires, l'un sur la synthèse du DNA cellulaire après infection par un virus polyome ou SV40, l'autre sur la génétique du virus polyome.

M. Luc MONTAGNIER, maître de recherche au C.N.R.S., a discuté les faits et les hypothèses concernant la persistance du génome des virus à RNA chez les cellules transformées.

M. Hubert CONDAMINE, sous-directeur de laboratoire au Collège de France, a donné deux séminaires, un sur les virus non défectifs hybrides entre adénovirus 2 et SV40, l'autre sur le transfert de DNA cellulaire par des virus de cellules eucaryotes.

ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Les recherches sur la cellule bactérienne et ses virus d'une part, sur les cellules de mammifères et leurs virus d'autre part, se sont poursuivies dans le laboratoire situé à l'Institut Pasteur.

I. - BACTERIES ET BACTERIOPHAGE

A. - Synthèse du DNA et division cellulaire

L'étude de ces problèmes fait intervenir une série de mutants conditionnels thermosensibles modifiés dans l'une des diverses étapes de la division cellulaire.

1. Synthèse du DNA

On a construit une série de double mutants portant la mutation *polA1-*, laquelle abolit l'activité de la DNA polymérase I, ainsi qu'une mutation thermoconditionnelle affectant la synthèse du DNA (mutations DNA A, B, C, D, E, F, ou G).

a) Synthèse du DNA *in vitro*

Le taux de synthèse du DNA de ces doubles mutants peut être mesuré *in vitro* grâce à la technique de traitement par le toluène de Moses et Richardson (1970). L'incorporation des dxTP par les doubles mutants traités par le toluène s'est révélée tout à fait semblable à celle qui est observée *in vivo* chez ces mêmes mutants. Le DNA synthétisé dans ces conditions est également similaire à celui synthétisé *in vivo* et notamment la synthèse a bien lieu de façon semi-conservative.

b) Les DNA polymérases des mutants dont la synthèse du DNA est perturbée

Parmi tous les mutants thermosensibles examinés, aucun n'a montré d'altération des activités des DNA polymérases I et II. En revanche, l'activité de la DNA polymérase III s'est révélée être thermosensible chez les mutants de la classe DNA E. Il en a donc été conclu que la DNA polymérase III d'*E. coli* est d'une certaine façon nécessaire à la réplication du chromosome bactérien.

c) Fusions de réplicons et suppression par intégration

La réplication du chromosome bactérien peut s'effectuer normalement à haute température chez des mutants dont l'initiation de la synthèse du DNA est thermosensible, à condition qu'un réplicon épisomique, tel que F, R, PL ou des mutants *P2sig* de P2, ait été intégré dans le chromosome. Les caractères du mutant de P2 ont été analysés. Ce mutant possède, dans la région dite « précoce » du génome phagique, une insertion représentant environ 2 % du DNA de P2. La suppression par intégration requiert l'expression du gène précoce A de P2, ainsi que l'insertion de P2 à proximité du locus *MetE* du chromosome bactérien. En effet, l'insertion du prophage près du locus *His* ne provoque pas la suppression étudiée.

2. *Analyse de la répartition, chez les descendants d'une cellule, des composants du DNA, de la membrane et de la paroi cellulaire*

Il a été mis au point une technique autoradiographique permettant de suivre la répartition des composants cités au cours des divisions cellulaires successives. Chez *E. coli*, il a été trouvé que le DNA, les lipides marqués par du glycérol ^3H ou de l'acide oléique ^3H et le DAP ^3H de la paroi, étaient tous distribués de façon homogène chez les descendants d'une cellule.

3. *Classification des divers processus de la division cellulaire*

On a étudié les caractéristiques morphologiques et physiologiques de mutants thermosensibles altérés dans l'initiation de la synthèse du DNA, la synthèse proprement dite ou la formation de septum intercellulaire. La localisation génétique de ces mutations a été effectuée. On trouve donc sept classes de mutations concernant la synthèse du DNA, cinq classes concernant la répartition des copies de DNA, cinq classes concernant la formation du septum et deux classes concernant la localisation correcte de ce septum. (Y. Hirota, G. Lindhal, M. Ricard, A. Fritsch, E. Lin, J. Mordoh.)

B. - *Etude morphologique*

1. *Mode de croissance de la couche mucopeptidique de la paroi de E. coli*

Cette étude a été faite en observant au microscope électronique des autoradiographies de paroi de *E. coli* marquées par de l'acide diaminopimélique (DAP, précurseur des mucopeptides). Après marquage au DAP effectué pendant plusieurs générations, puis chassage pendant une et deux générations, on constate que le DAP se distribue de façon tout à fait homogène. En revanche, si l'on fait des marquages brefs de 3 et 6 minutes, on retrouve 60 à 80 % de la radioactivité dans la zone centrale des parois. On peut donc

en conclure que le DAP est incorporé dans une zone centrale bien délimitée mais qu'il est ensuite très rapidement redistribué dans la totalité de la couche mucopeptidique. De plus, d'après la fréquence des parois marquées après marquages brefs, on peut en conclure que cette incorporation ne se fait pas de manière continue dans le temps mais seulement à certains moments du cycle de division. On cherche actuellement à préciser ce processus.

2. *Mode d'excrétion d'une estérase sécrétée par B. subtilis au cours de la sporulation*

L'analyse des fractions membranaires cytoplasmiques et des fractions membranaires mésosomiques montre que l'activité estérasique spécifique est de 10 à 20 fois plus élevée dans les mésosomes que dans les membranes cytoplasmiques. Cependant, il n'est pas possible de conclure pour l'instant que les mésosomes jouent un rôle essentiel dans l'excrétion de cet enzyme. (A. Ryter, C. Frehel, P. Bourgeois, R. Hellio).

C. - *Programme de développement du bactériophage*

1. *Etablissement de l'état lysogène*

Après la mise en évidence du gène *cro* dont le produit agit formellement comme un « répresseur de répresseur », on pouvait se demander comment était activé le gène CI dans l'établissement de l'état lysogène. Pour cela, l'action des gènes CII et CIII sur la synthèse de répresseur a été étudiée. Le dosage de répresseur, nécessaire à ce type d'expérience a été effectué de manière indirecte, en suivant la cinétique de synthèse d'une fonction virale, l'exonucléase. Les résultats montrent que la méthode est utilisable, en ce sens que chez un mutant *cro-*, le répresseur apparaît rapidement pour bloquer la synthèse de l'enzyme. Cet effet n'est pas observé lorsque le mutant porte une mutation dans le gène CI. Le fait qu'un effet similaire soit observé lorsque le phage *cro-* porte une mutation dans CII ou CIII montre que ces déterminants exercent une action positive sur la synthèse de répresseur. Divers autres aspects du problème ont été étudiés grâce à cette méthode : rôle de la réplication et de l'intégration dans l'établissement de l'état immun.

Par ailleurs, l'étude de souches lysogènes defectives portant des délétions plus ou moins étendues du prophage a été poursuivie. On a pu notamment en conclure que la région qui porte l'opérateur et le promoteur de l'opéron *cro-Q* comporte également le site d'action de *cro* sur CI et le promoteur de ce dernier gène, actif à l'état lysogène.

2. Contrôle de la réplication

On a poursuivi l'étude des dérivés de prophages défectifs de N capables de synthétiser activement les fonctions répliquatives O et P sans exercer d'effet létal sur leur hôte.

La plupart de ces mutants portent une mutation entre les gènes CII et O ; ils sont plus ou moins bloqués en *cis* dans leur réplication. Ces mutants sont probablement de type répliqueur zéro. L'étude des mutations réverses qui permettent à ces mutants de former une plaque de lyse a été entreprise.

Certains de ces dérivés portent une mutation ponctuelle dans le gène P (mutation π) qui les rend capables de croître sur certains mutants thermosensibles bactériens de la classe dna_B (mutants gro P-). Le présage d'un prophage portant l'une de ces mutations et une mutation dans le gène N permet de sauver avec une efficacité faible certains mutants bactériens du type dna_A bloqués dans l'initiation de la synthèse de DNA. (L. Pereira da Silva, P. Brachet, A. Rambach, I. Liwerant, R. Baldwin.)

D. - Régulation de la synthèse des protéines

Dans l'analyse du système permettant la fermentation du maltose chez *E. coli*, les efforts ont porté plus particulièrement sur l'élucidation de la structure et du rôle de la région *maltose B*. La localisation génétique et l'étude par complémentation d'une série de nouveaux mutants ont permis de montrer que les gènes de la région *maltose B* sont groupés en deux opérons dont les promoteurs sont contigus (ou chevauchant) et dont les polarités sont opposées. Le premier opéron comporte deux gènes monocistroniques *malK* et *lamB* ; l'expression du gène *lamB*, et par conséquent celle de l'opéron, est soumise à un contrôle positif par le produit du gène régulateur *malT* de la région *maltose A*. Le second opéron comporte deux gènes *malJ* et *malJ2* ; *malJ2* pourrait être composé de plus d'un cistron. Le rôle des gènes de la région *maltose B* est encore hypothétique. *malJ1*, *malJ2* et *malK* pourraient être des composants de la perméase à maltose tandis que *lamB* pourrait être un élément intervenant dans la synthèse (ou l'assemblage) des récepteurs bactériens pour le phage lambda. La poursuite de l'analyse génétique et l'étude biochimique des produits des gènes de la région *maltose B* devrait permettre d'éclairer ces points. (M. Hofnung.)

II. - ANALYSE DES CELLULES DE MAMMIFERES ET DE LEURS VIRUS

A. - Génétique des cellules de souris

1. Recherche d'une lignée de cellules de souris haploïdes ou hypoploïdes

a) Dans un premier temps, on a cherché à établir s'il était possible d'obtenir des fusions (à l'aide du virus Sendai) entre cellules de lignées germinales mâles de souris (spermatozoïdes et spermatides obtenus en grand nombre par dissection des canaux déférents) et différentes lignées de cellules en culture. Si le noyau haploïde est réactivé, on devrait obtenir, après fusion, des lignées de cellules ayant à la fois les caractéristiques de chacune des cellules parentales et un nombre de chromosomes égal à la somme de celui des deux cellules parentales.

On a effectué des croisements entre une lignée cellulaire de souris (3T3-2) thymidine-kinase négative (déficiency probablement due à une délétion car aucune réversion de ce caractère n'a été trouvée), dont le nombre modal de chromosomes est égal à 70 et des spermatides + spermatozoïdes de souris, thymidine-kinase positifs possédant 20 chromosomes. La technique de sélection des cellules thymidinekinase positives, seules capables de se multiplier en présence d'aminoptérine (milieu HAT, Littlefield) a été utilisée.

Dans ces conditions, quelques clones de cellules thymidine-kinase positives ont été obtenues qui pourraient être issus de la fusion d'une cellule haploïde et d'une cellule de la souche 3T3. Les cellules de ces clones ont environ 90 chromosomes. Pourtant, en l'absence d'autres marqueurs pour ces deux souches, il n'est pas possible d'affirmer qu'il s'agit bien d'une réactivation du noyau haploïde de la cellule mâle.

D'autres croisements hétérologues avec des lignées de cellules de hamsters ou humaines n'ont pas donné de résultat positif.

b) Des essais de traitement par des produits cancérigènes (méthylcholanthrène) de cellules de lignée germinale mâle ont été effectués. On a obtenu de rares clones, à croissance lente d'où une lignée a pu être établie. L'examen caryologique montre qu'elle a subi une polyploidisation (en moyenne 76 chromosomes au lieu de 20). Ces expériences seront reprises en utilisant des cellules de lignée germinale mâle issues de souris hétérozygotes pour plusieurs isozymes et éventuellement des marqueurs antigéniques. Un tel système devrait permettre de savoir si les clones permanents obtenus sont issus de cellules haploïdes puisqu'ils devraient être homozygotes quoique polyploïdes pour tout le génome.

2. Recherche de « phénants »

On admet actuellement que, dans un tissu donné, seule une fraction de l'information génétique contenue dans le génome de l'organisme est exprimée et que cette fraction varie d'un type cellulaire à un autre. Ceci s'applique également, avec certaines réserves, pour les lignées établies de cellules : certaines lignées tout encore capables d'exprimer des fonctions caractérisant leur tissu d'origine, mais non celle d'autres tissus. On peut se demander si de temps à autre, des modifications survenant dans les mécanismes maintenant un certain type de différenciation ne conduisent pas une cellule d'un type donné à produire une (ou plusieurs) protéines qu'elle ne produit pas habituellement. Si la protéine en question permet une sélection suffisamment puissante, de telles cellules à différenciation modifiée (phénants) devraient pouvoir être isolées par les méthodes classiques de génétique cellulaire.

Dans ce but on a utilisé un système qui permet de sélectionner toute cellule capable de croissance en l'absence de glutamine et capable de synthétiser de la glutamine-synthétase (cet enzyme ne se trouve dans l'organisme que dans les cellules du cerveau, du foie, de la rétine). Pour cela, on a choisi une souche de myélome (diploïde) glutamine-synthétase négative, pour laquelle l'absence de glutamine dans le milieu de culture entraîne la mort des cellules en 24 heures.

Une première souche glutamine-synthétase positive a été ainsi isolée dont le caryotype est identique à la souche d'origine. La présence de glutamine-synthétase a été démontrée, 1) par dosage chimique, 2) par inhibition de la croissance *in vivo* en présence d'un inhibiteur spécifique de l'enzyme (méthionine-sulfoximine). Cette inhibition est réversible. L'inhibiteur n'exerce aucun effet sur la croissance en présence de glutamine. L'isolement d'autres souches de ce type est en cours.

La souche d'origine, une cellule de myélome, produit une immunoglobuline en culture. La souche glutamine-synthétase positive sélectionnée ne produit plus cet anticorps. Il s'agit d'étudier s'il existe une corrélation entre l'expression de ces deux fonctions, à savoir si chaque fois qu'une cellule produit la glutamine-synthétase elle est immunoglobuline négative et si les deux fonctions sont exclusives l'une de l'autre. Des études dans ce sens sont en cours (clonages, hybridations par fusion entre cellules immunoglobuline⁺ et glutamine synthétase⁺). (F. Jacob, H. Jakob, F. de Vitry, J.-L. Guenet, H. Condamine, C. Babinet.)

B. - *Virus du polyome*

L'infection par un virus oncogène à ADN du groupe Papova (polyome, SV40) aboutit à une modification (transformation) de la régulation de la

synthèse d'ADN et de la division cellulaire. Le travail en cours vise à identifier par une combinaison de techniques génétiques et enzymologiques certaines fonctions virales impliquées dans ce processus.

1. *Endonucléase associée au virus du polyome*

L'hypothèse a été émise que le produit du gène du virus du polyome affecté par la mutation ts-a pourrait être une endonucléase spécifique, nécessaire au déclenchement de la réplication de l'ADN viral et/ou à l'intégration de celui-ci dans le génome de la cellule.

On a observé une activité endonucléolytique, mesurée par l'ouverture des molécules circulaires de l'ADN viral, dans des extraits de cellules permissives infectées par le virus. L'étude dans ce système est rendue difficile par diverses activités non spécifiques d'origine cellulaire.

On a donc cherché à obtenir des fractions actives partiellement purifiées. Une première méthode a été mise en œuvre, mais n'a pas donné encore de résultats probants. Elle consiste à purifier les noyaux des cellules infectées où est localisé le virus. Une fraction des endonucléases cellulaires localisées dans le cytoplasme (lysosomes) sont ainsi éliminées. Le matériel utilisé est la fraction protéique soluble d'extraits à basse force ionique de ces noyaux. Il subsiste néanmoins une proportion non négligeable, et variable d'une préparation à l'autre d'activités nucléasiques cellulaires. On cherche actuellement à éliminer celles-ci par immunoadsorption. Un antisérum est en cours de préparation, par injection à un mouton d'extraits de noyaux de cellules non infectées. Un gel pourra être préparé par polymérisation de cet antisérum par la glutaraldéhyde qui retiendra celles des protéines de la cellule non infectée qui auront provoqué une réaction immunologique.

Une seconde possibilité a été explorée en partant de l'hypothèse qu'un enzyme ayant une affinité élevée pour l'ADN viral pourrait rester associé à celui-ci au cours de la maturation du virus et être présent dans des préparations de virions. Des virions de polyome de type sauvage ont été soumis à une purification poussée par des centrifugations répétées à l'équilibre en chlorure de césium. Ces préparations montrent effectivement une activité endonucléasique qui semble ne pas être due à une contamination par une endonucléase d'origine cellulaire. En effet, d'une part, l'activité spécifique de ces préparations augmente avec le degré de purification du virus, d'autre part, cet enzyme présente des caractères distincts des endonucléases cellulaires connues : 1) l'activité est augmentée lorsqu'une concentration élevée d'ARN est présente pendant le dosage ; 2) des expériences de compétition en présence d'ADN étrangers (*Escherichia coli*, poly dAdT) montrent

que l'enzyme présente une affinité 100 à 1 000 fois supérieure pour l'ADN viral ; 3) des résultats préliminaires indiquent que l'enzyme n'effectue qu'un nombre limité de coupures sur l'ADN viral.

Cette activité n'a pas été observée avec des virions du mutant thermosensible *ts-a*. La signification de ce dernier résultat est en cours d'étude ; il est possible, mais non démontré, que l'enzyme soit le produit du gène viral marqué par cette mutation.

2. Etude génétique de la cellule transformée

Une condition favorable, sinon nécessaire, à une étude de génétique cellulaire est que la cellule étudiée possède un caryotype stable. Les lignées diploïdes de hamster chinois sont dans ce cas ; ces lignées présentent, en plus, l'avantage de produire des dérivés monosomiques, haploïdes pour l'ensemble des gènes d'un chromosome, ce qui peut permettre l'isolement de mutants thermosensibles récessifs. Par ailleurs, les cellules transformées comportant un ou plusieurs génomes viraux intégrés, il est utile que ceux-ci puissent être « réactivés » en produisant du virus dont les caractères génétiques pourront être indépendamment étudiés. On sait que c'est le cas de cellules transformées par SV-40 lorsqu'elles sont fusionnées par le virus de Sendai avec des cellules permissives (singe).

Une lignée établie diploïde de hamster chinois (CCL 39) a donc été transformée par le virus SV-40. Plusieurs clones ont été isolés qui, 1) présentent les caractères typiques d'une cellule transformée (croissance en agar, absence d'inhibition de contact), 2) ont un nombre de chromosomes stable et égal au nombre diploïde et 3) sont porteurs de l'antigène nucléaire T de SV-40. On a montré, en outre, que ces cellules ne produisent pas spontanément de virus, mais que la synthèse de celui-ci est induite, à basse fréquence, dans les hétérocaryons produits par fusion avec des cellules permissives.

On cherche maintenant à isoler des mutants de ces cellules qui aient perdu le phénotype transformé et, préférentiellement, des mutants conditionnels (transformés à basse température, normaux à haute température). Plusieurs méthodes existent pour sélectionner ce type de mutants. A partir des mutants éventuellement isolés, le virus obtenu par fusion sera étudié pour établir si la mutation affecte un gène viral ou un gène cellulaire. Les deux types de mutation devraient être obtenus et seront ensuite séparément analysés (F. Cuzin, P. Rouget, D. Blangy, C. Ebersolt, D. Paulin.)

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. PEREIRA DA SILVA et F. JACOB, *Regulation of repressor expression in lambda* (Proc. Natl. Acad. Sci., 1970, 66, p. 855-862).

B. SHAPIRO, A. SICCARDI, Y. HIROTA et F. JACOB, *On the process of cellular division in E. 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 E. coli. V. Incorporation of deoxynucleotide triphosphates by DNA thermosensitive mutants of E. coli also lacking DNA polymerase activity* (Proc. Natl. Acad. Sci., 1970, 67, p. 773-778).

F. CUZIN, M. VOGT, M. DIECKMANN et P. BERG, *Induction of virus multiplication in 3T3 cells transformed by a thermosensitive mutant of polyoma virus* (J. Mol. Biol., 1970, 47, p. 317).

A. SICCARDI, B. SHAPIRO, Y. HIROTA et F. JACOB, *On the process of cellular division in E. coli. IV. Altered protein composition and turnover of the membranes of thermosensitive mutants defective in chromosomal replication* (J. Mol. Biol., 1971, 56, p. 475-490).

D. SCHUBERT, S. HUMPHREY, F. de VITRY et F. JACOB, *Induced differentiation of a neuroblastoma* (Developmental Biol., 1971, 25, p. 514-546).

G. LINDAHL, Y. HIROTA et F. JACOB, *On the process of cellular division in E. coli. VII. Replication of the bacterial chromosome under control of prophage P2* (Proc. Natl. Acad. Sci., 1971, 68, p. 2407-2411).

E. C. C. LIN, Y. HIROTA et F. JACOB, *On the process of cellular division in Escherichia coli. VI. The use of methocel-autoradiographic method for the study of cellular division in E. coli* (J. Bact., 1971, 108, p. 375-385).

C. BABINET, *Propriétés de dominance de quelques mutations conférant la résistance à la rifampicine chez E. coli K12 (Biochimie, 1971, 53, p. 507).*

H. CONDAMINE, R. P. CUSTER et B. MINTZ, *Pure strain and genetically mosaic liver tumors histochemically identified with the β -glucuronidase marker in allophenic marker (gene control of neoplasia/hepatoma susceptibility) (Proc. Natl. Acad. Sci., 1971, 68, p. 2032-2036).*

F. CUZIN, D. BLANGY et P. ROUGET. *Activité endonucléasique de préparations, purifiées du virus du polyome (C. R. Acad. Sci., 1971, 273 p. 2650-2653).*

A. FRITSCH et A. WORCEL, *Symmetric multifork chromosome replication in fast growing Escherichia coli (J. Mol. Biol., 1971, 59, p. 207-211).*

Y. HIROTA, J. MORDOH, I. SCHEFFLER, G. LINDAHL et F. JACOB, *The genetic approach to DNA replication and its control in E. coli (Fed. Proc., 1971).*

M. GEFTER, Y. HIROTA, T. KORNBERG, C. BARNOUX et J. WECHSLER, *Analysis of DNA polymerase II and III in DNA thermosensitive mutants of E. coli (Proc. Natl. Acad. Sci., 1971, 68, p. 3150-3153).*

Y. NISHIMURA, L. CARO, C. BERG et Y. HIROTA, *Chromosome replication in E. coli. IV. Control of chromosome replication and cell division by an integrated episome (J. Mol. Biol., 1971, 55, p. 441-456).*

Y. HIROTA, M. RICARD et B. SHAPIRO, *The use of thermosensitive mutants of E. coli in the analysis of cell division (Biomembranes, 1971, 2, Manson ed.).*

M. HOFNUNG, *La région maltose B chez Escherichia coli K12 : un complexe de deux opérons de polarités opposées (Thèse de doctorat es Sciences, Paris, 1972).*

P. BRACHET, C. LEURS, P. BARRAND et L. PEREIRA DA SILVA, *Sur les mutants réverses des prophages λ défectifs du segment X (C. R. Acad. Sci., 1970, 270, p. 734-735).*

W. G. SPIEGELMAN, S. F. HEINEMANN, P. BRACHET, L. PEREIRA DA SILVA et H. EISEN, *Regulation of the synthesis of phage lambda repressor (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1970, 35, p. 325-330).*

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

A. RAMBACH et P. BRACHET, *Sélection de mutants du bactériophage λ incapables de se répliquer (C. R. Acad. Sci., 1971, 272, p. 149-152).*

A. RYTER, *Etude de la croissance de la membrane chez B. subtilis* (7° Congrès Intern. Microsc. Electron., Grenoble, 1970, p. 341).

A. RYTER, *Croissance de la paroi et de la membrane pendant la division nucléaire chez B. subtilis* (10° Int. Cong. Microb., Mexico, 1970).

C. FREHEL, B. FERRANDES et A. RYTER, *Réactions d'oxydo-réduction au niveau des membranes cytoplasmiques et mésosomiques de B. subtilis* (Biochim. Biophys. Acta, 1971, 234, p. 226-241).

C. FREHEL, A.-M. BEAUFILS et A. RYTER, *Etude au microscope électronique de la croissance de la paroi chez B. subtilis et B. megaterium* (Ann. Inst. Pasteur, 1971, 121, p. 139-146).

A. RYTER, *Etude de la croissance de la membrane chez B. subtilis au moyen de la distribution des flagelles* (Ann. Inst. Pasteur, 1971, 121, p. 271-288).

F. JACOB, *La logique du vivant : une histoire de l'hérédité* (Gallimard éd., Paris, 1970).

G. LINDAHL, Y. HIROTA et F. JACOB, *On the process of cellular division in E. coli. VII. Replication of the bacterial chromosome under control; of prophage P2* (Proc. Nat. Acad. Sci., 1971, 68, p. 2407-2411).