

## Génétique cellulaire

M. François JACOB, professeur

Le cours de cette année a été consacré aux méthodes d'analyse génétique utilisées dans l'étude de la cellule. Tout d'abord a été résumé le cas des bactéries chez lesquelles l'analyse génétique, quoique relativement récente, s'est développée pour atteindre un surprenant degré de précision et de subtilité. Ensuite a été considéré le cas des cellules de mammifères chez lesquelles, en dépit d'un effort considérable poursuivi depuis dix ans dans nombre de laboratoires, les résultats restent encore fort limités. Peu à peu diminue l'espoir, longtemps entretenu, de pouvoir appliquer ici ce qui avait si bien réussi là.

On a tout d'abord rappelé brièvement les méthodes permettant d'isoler sélectivement des mutants bactériens déficients dans une fonction choisie, ainsi que les mécanismes de transduction et de conjugaison permettant d'analyser l'équipement génétique des bactéries. On a ensuite décrit en détail les méthodes permettant de sélectionner des remaniements chromosomiques, délétions, transpositions ou fusions, qui simplifient de manière considérable la localisation des mutations et l'étude des fonctions.

Des délétions sont le plus souvent isolées lorsqu'il est possible de sélectionner, non pour un seul, mais pour deux ou plusieurs événements mutationnels touchant des gènes voisins. C'est ainsi que l'une des régions du chromosome bactérien contient successivement : les gènes déterminant les enzymes impliqués dans l'utilisation du galactose, un gène de sensibilité au chlorate, la région d'attachement du prophage lambda, un autre gène de sensibilité au chlorate. Il est relativement simple d'obtenir des structures génétiques permettant de sélectionner des mutations survenant soit dans l'un des gènes galactose, soit dans l'un des gènes de sensibilité au chlorate, soit dans le prophage lambda après lysogénéisation. En sélectionnant simultanément pour deux ou même trois mutations, on obtient ainsi des séries de délétions, amputant des segments plus ou moins longs de chromosome bactérien. On parvient notamment à isoler des familles de délétion qui, pénétrant toutes dans un gène donné par une même extrémité, mordent plus ou moins loin à l'intérieur de ce gène. Il devient très simple alors

de localiser n'importe quelle mutation ponctuelle touchant ce gène en cherchant celles des délétions avec lesquelles cette mutation peut donner le type sauvage par recombinaison.

Mention particulière doit être faite du phage  $\mu$ . Ce phage est capable de lysogéniser des bactéries sensibles mais, contrairement à la plupart des phages tempérés connus, il possède la propriété de s'insérer en n'importe quel point, semble-t-il, du chromosome bactérien. En s'insérant dans un gène, il interrompt la séquence déterminant celle de la protéine correspondante et entraîne donc une mutation. En infectant des bactéries sensibles par le phage  $\mu$  et en appliquant une méthode de sélection choisie, on obtient des mutations dues à l'insertion de  $\mu$  dans le gène désiré. Non seulement  $\mu$  paraît capable de s'insérer en de très nombreux points dans un même gène ; mais son système d'insertion est tel que, par infection multiple,  $\mu$  permet à n'importe quel autre segment d'ADN de s'insérer dans le chromosome bactérien. C'est donc un outil particulièrement précieux pour l'analyse génétique.

Les transpositions de matériel chromosomique peuvent être réalisées par l'intermédiaire d'épisomes comme le facteur sexuel. On sait, en effet, que, en quittant l'état intégré chez une bactérie Hfr pour retourner à l'état autonome  $F^+$ , le facteur  $F$  peut emporter un segment chromosomique adjacent. C'est le cas, par exemple, du facteur  $F$ -Lac où les gènes Lac du chromosome ont été insérés dans le facteur  $F$ . En outre on connaît des mutations thermosensibles du facteur  $F$  qui empêchent sa replication autonome sans gêner sa replication comme élément intégré du chromosome. En utilisant des souches et des pressions sélectives convenables, il est alors possible d'isoler des clones chez lesquels le facteur sexuel avec les gènes chromosomiques qu'il héberge sont insérés dans une région choisie du chromosome. C'est ainsi, par exemple, qu'une série de souches a été obtenue chez lesquelles les gènes lactose n'occupent plus leur position habituelle, mais sont réinsérés dans toute une série de sites distribués le long du chromosome. Ils peuvent être insérés soit selon leur orientation normale, soit en sens inverse.

L'un des principaux intérêts de ces transpositions réside dans la possibilité d'obtenir ainsi des fusions entre opérons distincts. La fusion résulte d'une délétion qui, en mordant par une extrémité sur un opéron et par l'autre sur un second opéron, aboutit à la formation d'une seule unité de transcription et de régulation avec les segments restant de chaque opéron. Pour que puissent être obtenues de telles fusions, certaines conditions doivent être remplies. Il faut notamment que deux opérons bien connus ne soient pas trop éloignés l'un de l'autre ; que n'existe pas entre eux un gène gouvernant une fonction indispensable à la croissance et à la multiplication de la bactérie ; que l'on ait les moyens de sélectionner de telles délétions. Avec les bactéries de type sauvage, ces conditions ne sont qu'exceptionnellement

remplies. En utilisant des bactéries diploïdes pour les gènes Lac et le segment chromosomique adjacent, on a pu obtenir des fusions entre l'opéron lactose et un opéron gouvernant la production d'enzymes impliqués dans la biosynthèse des purines. Dans ce système, la délétion enlève le segment proche de l'opérateur de l'opéron lactose et le segment éloigné de l'opérateur dans l'opéron purine. Après fusion, l'ensemble des gènes restant, et notamment ceux de l'opéron lactose, sont soumis à la régulation répressive par les purines. Cependant, les conditions nécessaires pour obtenir de telles fusions sont plus simples à remplir après transposition. On peut, en effet transposer un opéron à proximité immédiate d'un autre opéron, dans la région duquel on connaît des méthodes permettant de sélectionner des délétions. C'est ainsi que Beckwith et Signer ont transposé l'opéron lactose au voisinage de l'opéron tryptophane, l'opéron lactose étant inséré soit dans son orientation normale, soit en sens inverse. Dans le premier cas, les fusions obtenues placent des gènes lactose sous régulation tryptophane, comme dans le cas de l'opéron purine. Dans le second cas, les opérons sont placés tête-bêche. La délétion enlève dans chaque opéron l'extrémité éloignée de l'opérateur. Chaque opéron conserve son système de régulation propre, mais chacun est transcrit en sens contraire de l'autre, donc chacun sur une chaîne différente de l'ADN. On n'observe alors aucune interférence, chaque système étant transcrit à son rythme propre, que l'autre soit ou non dérégulé.

On voit à quel degré de subtilité technique est parvenue l'analyse génétique chez les bactéries. Il en va tout autrement avec les cellules d'organismes supérieurs. Une telle étude ne peut être entreprise qu'avec des lignées établies puisque les cellules prélevées de l'animal et mises en culture primaire ne peuvent en général se diviser qu'un nombre de fois très limité. Mais même avec les lignées établies, l'analyse génétique est compliquée par toute une série de difficultés : difficultés de culture, de clonage, de ploïdie surtout. Nombre de ces lignées en effet sont polyploïdes. Et même chez celles qui semblent présenter un caryotype à peu près euploïde, l'analyse systématique a révélé de redoutables anomalies. En suivant, par exemple, l'évolution des caryotypes dans une série de clones isolés à partir d'une lignée apparemment euploïde de hamster ( $2n = 22$ ), on voit évoluer le nombre des chromosomes qui tantôt diminue vers 18-19, tantôt augmente vers 23-24. Même chez des clones ayant une distribution modale autour de 18, on voit souvent les caryotypes remonter vers 21-22. En outre, on voit fréquemment la morphologie des chromosomes se modifier, des translocations apparaître, des chromosomes minuscules surgir pour redonner des cultures ayant en moyenne  $2n$  chromosomes. Dans toutes les lignées établies, il semble donc y avoir un haut degré de polymorphisme génétique, ce qui n'est pas de nature à simplifier l'analyse génétique.

Bien entendu, l'idéal pour une telle analyse serait de pouvoir disposer de lignées haploïdes. Ceci a été obtenu avec des cellules de grenouille par

Freed et Freed. Chez certaines espèces, en effet, des embryons haploïdes androgénétiques se développent jusqu'au stade têtard. A partir du bourgeon de la queue, on peut obtenir des cultures dont certaines restent haploïdes (90 à 98 % de la population) pendant 50 générations et plus. Ces cellules se multiplient dans les mêmes milieux que les cellules diploïdes et à peu près à même vitesse. Toutefois, quoiqu'isolées depuis plus de deux ans maintenant, ces cellules ne semblent pas encore avoir été utilisées pour les études génétiques. Avec les cellules de mammifères, différentes méthodes ont été utilisées pour tenter d'obtenir des cellules haploïdes : fusion de spermatozoïdes ou spermatides avec des cellules irradiées ; isolement à partir d'embryons de souris parthénogénétiques. Aucun résultat n'a encore été obtenu. Il faut donc pour l'instant se contenter du chromosome X chez les cellules issues d'organismes mâles.

Autre difficulté avec les cellules de mammifères, c'est la nature des variants qu'elles permettent d'obtenir. Pour être qualifiée de mutation, une variation doit en effet satisfaire à un certain nombre de critères, de recombinaison, de réversion, d'apparition sous l'action d'agents mutagènes, etc... La possibilité de vérifier ces conditions dépend bien souvent de l'origine des variants utilisés.

Le cas où la nature mutationnelle des variations peut le plus clairement être établie est celui des cellules issues de malades porteurs d'une affection d'origine génétique. On a récemment isolé des lignées établies à partir de malades porteurs de diverses lésions telles que la galactosémie ou la maladie de Lesch-Nyhan. Cette dernière correspond à un syndrome grave lié à un défaut génétique dans le métabolisme des purines. La mutation localisée sur le chromosome X est récessive et entraîne une altération de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) qui convertit diverses purines en leur 5' nucléotide par réaction avec le phosphoribosyl-1 pyrophosphate. Les cellules dépourvues de cet enzyme sont résistantes à la 8-azaguanine. En revanche elles sont incapables de se multiplier dans le milieu sélectif HAT (hypoxanthine-améthoptérine-thymidine). Ce système permet donc une sélection dans les deux sens. Il se prête tout particulièrement bien à l'analyse génétique. Il permet par exemple d'étudier l'inactivation de l'un des chromosomes X décrite par Mary Lyon.

Un autre cas où les variations obtenues semblent bien dues à des mutations est celui des déficiences en facteurs de croissance. Un système de sélection pour les clones déficients en un métabolite synthétisé par les cellules pseudodiploïdes de hamster a été mis au point par Puck. Toute une série de clones a ainsi été isolée qui exigent pour leur croissance de la proline ou de la glycine ou de l'adénine, etc... Selon des critères variés, ces clones semblent bien être formés par mutations. Le faible taux de réversion observé les rend très maniables pour certains aspects de l'analyse génétique.

En revanche on n'a le plus souvent que peu d'information sur la nature des autres variants isolés dans des cultures cellulaires, en particulier les clones thermosensibles et les clones résistants à certaines substances inhibitrices. A partir de matériels divers, plusieurs laboratoires ont isolé, avec ou sans sélection, des clones thermosensibles, capables de se multiplier à basse (30 - 35°) mais non à haute (37 - 40°) température. Mais les possibilités d'analyse en restent encore fort limitées. Quant aux inhibiteurs, certains permettent d'isoler des clones où la résistance paraît liée à la disparition d'une activité enzymatique : thymidine-kinase avec le 5-déoxybromouridine ou hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase avec l'azaguanine ou la thioguanine ; dans ce dernier cas les clones obtenus ressemblent à ceux obtenus à partir de malades de type Lesh-Nylan. Mais tous les clones résistants à ces analogues ne sont pas dépourvus d'activité enzymatique. En outre, des expériences dues à Morgan Harris montrent que, contrairement à toute attente, il n'y a aucune relation entre la fréquence de ces variations et la ploïdie des cellules utilisées.

Il n'est donc pas évident que toutes ces variations soient le résultat de mutations géniques, c'est-à-dire de modifications survenues dans la séquence d'ADN. Pour certaines d'entre elles, deux autres types d'explication au moins peuvent être invoqués. L'une mettrait en jeu des changements de membrane, l'autre des perturbations de l'équilibre chromosomique. Tout ceci montre bien combien l'analyse génétique de cellules de mammifères en est encore à ses débuts.

#### SÉMINAIRES

Le cours a été complété par une série de séminaires consacrés à certains aspects de l'analyse génétique de la cellule.

M. Philippe BRACHET, chargé de recherche à l'Institut Pasteur, a décrit *l'isolement et la caractérisation de mutants polaires chez les bactéries* ;

M. Luiz PEREIRA da SILVA, maître de recherche au C.N.R.S., a donné un séminaire sur *la morphogenèse des bactériophages* ;

M. Michael YARMOLINSKY, maître de recherche au C.N.R.S., a donné un séminaire sur *le transfert de gènes bactériens sur des bactériophages* ;

M. François CUZIN, maître de recherche au C.N.R.S., a discuté des *méthodes d'analyse chez les virus à ADN* ;

M. André BERKALOFF, professeur à l'Université de Paris XI (Orsay), a discuté *l'utilisation de mutants thermosensibles pour l'analyse du cycle d'un virus à ARN* ;

M. Hubert CONDRAMINE, sous-directeur de laboratoire au Collège de France, a donné deux séminaires : l'un sur *les mutations somatiques in vivo chez les mammifères* ; l'autre sur *l'inactivation d'un chromosome X ou « phénomène de Mary Lyon »*, dans les cellules de femelles de mammifère ;

M<sup>lle</sup> Karen ARTZT, professeur assistant à l'Université Cornell, a donné deux séminaires : un sur *le locus T*, l'autre sur *la région H2 de la souris*.

#### 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. - ANALYSE DE LA CELLULE BACTERIENNE

L'étude de la division cellulaire fait intervenir une série de mutants conditionnels thermosensibles d'*E. coli* modifiés dans l'une des diverses étapes de la division cellulaire.

##### A. - Synthèse du DNA

On a montré que la DNA polymérase III est indispensable à la répllication *in vivo* du chromosome d'*E. coli*, tandis que la DNA polymérase II ne l'est pas. Les produits d'un certain nombre de gènes (dnaA à dnaG) ont également été trouvés indispensables à la répllication *in vivo* du DNA.

##### a) Les mutants thermosensibles d'*E. coli* modifiés dans la répllication du DNA

On a construit une série de double mutants portant la mutation polA1<sup>-</sup> (De Lucia et Cairns, 1969), 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).

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 *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 de modifications dans les 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 *dnaE*. La DNA polymérase III d'*E. coli* est donc nécessaire à la réplication du chromosome bactérien.

c) *Un mutant dépourvu de l'activité DNA polymérasique II*

L'un des mutants (*polB1*) est dépourvu de DNA polymérase II et cependant croît normalement à 30° comme à 41°. Les extraits obtenus à partir de ce mutant ont une activité DNA polymérasique II inférieure à 0,1 % de l'activité mesurable chez la souche sauvage. Une expérience de reconstruction *in vitro*, consistant à mélanger des proportions de DNA polymérase II provenant du mutant et de la souche normale, a montré que l'extrait du mutant n'inhibait pas l'activité de l'enzyme sauvage.

La mutation *polB1* est une mutation récessive devant l'allèle sauvage ; elle a été localisée à proximité de la position 1.5' de la carte chromosomique d'*E. coli*.

On peut donc conclure que : 1) les protéines déterminées par l'ensemble des gènes *dnaA* à *dnaG* sont indispensables à la réplication *in vivo* du DNA d'*E. coli* ; 2) parmi les enzymes DNA polymérase I, II et III, seule la dernière est indispensable à la réplication du DNA d'*E. coli* comme à celle du DNA des phages tempérés examinés et des facteurs F et R.

B. - *Analyse de la répartition, chez les descendants d'une cellule, de la paroi cellulaire*

Une technique combinant l'utilisation de la microscopie électronique et de l'autoradiographie a été mise au point et appliquée à l'étude de la distribution de la radio-activité associée à la paroi marquée par du DAP-<sup>3</sup>H pendant de courtes périodes. Lorsque la paroi a été préparée immédiatement après un bref marquage, la radioactivité a été principalement trouvée dans la zone centrale des cellules. En revanche, lorsque les cellules marquées sont cultivées pendant plus d'une génération avant que soit extraite la paroi cellulaire, la radioactivité est alors répartie de façon homogène. Les processus de ségrégation qui interviennent au cours de la croissance cellulaire semblent donc être les suivants :

a) une croissance zonale de l'enveloppe cellulaire, conforme aux prédictions au modèle du réplicon,

b) une répartition homogène des éléments anciennement et nouvellement synthétisés. Il est possible que ces processus soient étroitement coordonnés pendant la croissance cellulaire et ces techniques d'étude seront appliquées à des mutants diversement altérés dans le cycle de division cellulaire.

### C. - Classification des divers processus de la division cellulaire

#### a) Généralités sur les mutants isolés

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 sept classes de mutations concernant la synthèse du DNA, deux classes concernant la formation du septum et deux classes concernant la localisation correcte de ce septum.

#### b) Mutants de type *fts*

L'étape terminale de la division cellulaire, la formation du septum intercellulaire et la séparation des cellules a été étudiée par l'isolement et la caractérisation de mutants incapables de former un septum. Vingt mutants formant à haute température des filaments multinucléés ont été isolés. Les mutations correspondantes sont distribuées en diverses régions du chromosome d'*E. coli*, parmi au moins sept gènes ou groupes de gènes (de *ftsA* à *ftsG*). Les allèles mutés de ces gènes sont récessifs devant les allèles sauvages dans le cas des loci *fts A*, *C*, *E* et *G* et dominants dans le cas du locus *ftsD*. La capacité des filaments formés à 41° de se diviser à nouveau à 30°, en présence ou en absence de synthèses protéiques, a été étudiée chez ces mutants, et des réponses variées, caractéristiques du locus envisagé ont été enregistrés (Y. Hirota, G. Lindahl, M. Ricard, E. Solomon, A. Fritsch, A. Rambach, A. Ryter, C. Frehel, P. Bourgeois, R. Helliö).

### D. - Régulation de la synthèse des protéines

Les travaux antérieurs ont conduit à l'identification des gènes de structure et de régulation impliqués dans le métabolisme du maltose chez *E. coli*. Cette analyse a été poursuivie cette année.

La région *malB* d'*E. coli* *K12* comprend un groupe de gènes (*malJ*<sub>1</sub>, *malJ*<sub>2</sub>, *malK*) impliqués dans la perméation du maltose et un gène *lamB* impliqué dans la biosynthèse des récepteurs bactériens pour le phage lambda. Un modèle avait été précédemment proposé selon lequel *malJ*<sub>1</sub> et *malJ*<sub>2</sub> d'une part, *malK* et *lamB* d'autre part constitueraient deux opérons de polarités opposés. L'analyse génétique de la région a été poursuivie dans deux directions.

Des études de complémentation en présence d'un suppresseur de polarité ont permis de confirmer le modèle proposé et de préciser que les deux opérons se chevauchent vraisemblablement dans la région de leurs promoteurs. En

outre il a été montré que le gène *malJ*<sub>2</sub> est monocistronique : les cas de complémentations entre mutants *malJ*<sub>2</sub> sont donc probablement dus à ce que le produit actif de ce gène est un oligomère.

L'isolement et l'étude d'une série de mutations entraînant la résistance au phage lambda et localisées dans la région *malB* a permis de déterminer l'existence de plusieurs classes de mutations du gène *lamB* et de plusieurs classes de mutants du phage lambda (notés lambda h ou lambda super h) capables de croître ou non dans une souche suivant la mutation affectant le gène *lamB*. Cette analyse pourra se poursuivre suivant les deux mêmes directions. D'une part la connaissance de la structure de la région des promoteurs des opérons *malB* pourra éclairer le mécanisme d'expression des gènes de la région. D'autre part, la caractérisation complète des classes de mutants dans le gène *lamB* constitue une approche efficace dans l'étude des interactions entre bactéries et phages (M. Hofnung, A. Jezierka).

## II. - ANALYSE DES CELLULES DE MAMMIFERES

Pour étudier le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire, on a choisi de concentrer les efforts sur deux types de matériel : le développement de l'œuf de souris dans ses premiers stades et le tératocarcinome de la souris. Chacun de ces matériels complète l'autre en quelque sorte et la combinaison des deux devrait permettre de mener de front une série d'analyses mettant en jeu des techniques différentes. Il serait important, par exemple, de pouvoir étudier, par des méthodes immunologiques et biochimiques, les membranes cellulaires au cours du développement. Avec l'œuf seul, cela est rendu à peu près impossible par la difficulté d'obtenir du matériel en quantité suffisante. L'espoir est de pouvoir utiliser le tératocarcinome comme source d'antigène et de membranes cellulaires. En première approximation, en effet, les cellules des tératocarcinomes indifférenciés se comportent comme des blastomères et l'on peut en obtenir des souches cellulaires présentant différents types de différenciation. On peut donc espérer obtenir des lignées de cellules en culture possédant le même génotype mais des degrés variés de différenciation. Ce matériel devrait permettre d'entreprendre une analyse biochimique et immunologique dont les résultats pourraient, dans un second temps, être étendus à l'œuf. C'est dans cette direction que s'oriente le travail des différents groupes.

### A. - Cultures cellulaires

Les études entreprises avec les souches de myélome qui nous ont conduit à l'isolement de « phénants » glutamine-synthétase positifs ont été terminées au cours de cette année et ne sont pas poursuivies pour l'instant.

Les recherches se sont concentrées sur l'étude des cellules de tératome. Plusieurs souches de tératocarcinomes ont été isolées qui ne donnent pas de différenciation en culture, tout en conservant une pluripotentialité qui s'exprime *in vivo* après injection. Ces souches ont été isolées soit à partir de tératomes spontanés de souris (souche 129 de Stevens), soit à partir de corps embryonnaires provenant d'une tumeur transplantable (lignée 970 de Stevens).

On a isolé également d'autres lignées permanentes, différenciées celles-là, à partir de corps embryonnaires placés en culture.

L'étude de la surface cellulaire des cellules de tératocarcinome a été entreprise à l'aide de deux techniques :

a) analyse antigénique. Celle-ci vise d'abord à repérer sur les cellules de tératocarcinome l'existence d'antigènes déjà connus. Les premiers résultats indiquent que l'antigène H2 n'est pas décelable à la surface de ces cellules. D'autre part, on a entrepris la préparation d'anticorps contre les déterminants de surface du tératocarcinome en injectant des cellules, soit dans des souris isogènes, soit dans des lapins ;

b) analyse biochimique. On a commencé à mettre au point une méthode d'extraction des membranes et une analyse qualitative et quantitative des composés membranaires : catalogue des protéines membranaires par électrophorèse en présence de détergent, analyse globale des composants, catalogue des antigènes de surface par immuno-électrophorèse.

#### B. - Développement embryonnaire

1) On a tout d'abord cherché à obtenir un milieu permettant de cultiver *in vitro* des embryons de souris depuis le stade une cellule jusqu'au stade blastocyste. A partir du milieu de Whitten et Biggers, diverses variations ont été essayées (nature de l'eau, concentration en sels, en pyruvate...).

2) La réimplantation d'embryons prélevés à un stade morula ou blastocystes, dans le testicule d'un mâle histocompatible, a été examinée dans plusieurs conditions :

a) des embryons d'hybrides CBA/T6  $\times$  C 57 BL/6 implantés sous la capsule du testicule d'un mâle hybride, fournissent, dans une grande proportion de cas, un développement repérable sous forme d'un point hémorragique. On n'a pas tenté de retransplanter le tissu d'origine embryonnaire ainsi obtenu, mais plutôt de le mettre en culture. Dans plusieurs cas, des cellules d'apparence semblable à celles de lignées tératocarcinomateuses étaient visibles dans de telles cultures. Il n'a pas été possible cependant d'isoler de lignées tératocarcinomateuses stables ;

b) les mêmes expériences de réimplantation ont été tentées avec des embryons d'origine parthénogénétique, obtenus par chocs électriques, selon la

méthode de Tarkowski. Des essais effectués sur la souche C57 BL/6 se sont révélés négatifs, aucune activation parthénogénétique n'ayant été obtenue. En revanche, les ovules d'hybrides CBA/T6 × C57 BL/6 répondent assez bien au stimulus électrique et il a été possible d'obtenir des blastocystes parthénogénétiques avec cette souche. Réimplantés dans le testicule, ces blastocystes, à la différence de ceux d'origine normale, ne fournissent aucun développement ;

c) les embryons de la souche C57 BL/6, implantés dans le testicule, ne fournissent pas non plus de développement : trois semaines après implantation, l'examen histologique n'a révélé aucune trace de l'embryon implanté.

3) On a tenté d'adapter à la souris la méthode de détection électrophorétique de la phosphoglycérate-kinase connue dans le cas de l'homme. La méthode de détection par électrophorèse sur gel d'amidon s'est révélée peu sensible et peu pratique. La mise au point d'une autre méthode, par électrophorèse sur gel d'acrylamide va être essayée, le but étant de rechercher chez la souris des variants de la phosphoglycérate-kinase, enzyme dont on sait qu'il est lié au sexe chez l'homme et chez d'autres mammifères.

### C. - *Génétique de la souris*

Une analyse de la mutagenèse expérimentale chez la souris a été entreprise. Deux expériences sont en cours :

a) recherche des mutations à tous les locus après mutagenèse au thiotepa (100 µg/male 1 semaine après l'injection) par la méthode dite « cross-outcross-backcross ». Soixante gamètes ont été étudiés avec les résultats suivants : une mutation dominante (létale à l'état homozygote), allélisme avec « Steel » (S1) et « Dominant spotting » (W) en cours ; une mutation récessive appelée (ml) entraînant des malformations osseuses sévères (étude en cours) ; nombreuses mutations récessives sublétales en cours d'isolement.

b) Recherche des mutations à tous les locus après mutagenèse cumulée d'une population « inbred » par les rayonnements gamma (137 Cs - 450 rads × 2 à 24 heures d'intervalle) à chaque génération. Là encore les gamètes sont analysés par la méthode « cross-intercross-backcross ». L'expérience est encore en cours.

c) Une recherche de mutations létales liées au sexe a été entreprise. Pour cela, on recherche systématiquement, dans la descendance de mâles Tabby mutagénisés et croisés avec des femelles sauvages, des femelles apparemment sauvages, où les clones Tabby ne sont donc pas apparus. Certaines de ces femelles pourraient être porteuses d'une mutation létale sur le chromosome X qui porte la mutation Tabby, les clones cellulaires où ce chromosome X est

resté actif, étant alors voués à la disparition (F. Jacob, H. Jakob, T. Boon, D. Dexter, H. Condamine, C. Babinet, G. Gachelin, M.-H. Buc, K. Artzt, J. Gaillard, J.-L. Guénet, R. Fauve, P. Dubois, J.-F. Nicolas).

### III. - ETUDE D'UN VIRUS ONCOGENE

Le génome des virus oncogènes du groupe Papova (Polyome, SV 40) porte une information génétique correspondant à la synthèse de 4 à 8 protéines. La présence d'une ou plusieurs de ces protéines modifie les mécanismes régulateurs de la division cellulaire et fixe la cellule dans l'état transformé (tumoral). L'identification de ces protéines est théoriquement possible dans la mesure où l'on dispose de mutations thermosensibles de gènes viraux, mais est techniquement compliquée par le bruit de fond important de la synthèse des protéines cellulaires. Pour résoudre ce problème, deux voies d'approche ont été explorées : 1) l'étude d'une endonucléase présente dans les préparations de virus purifiées, et 2) la mise au point d'une méthode spécifique de séparation des protéines virales à partir de noyaux de cellules infectées ou transformées.

#### A. - Recherche d'activités enzymatiques présentes dans des cellules infectées et non décelables dans la cellule normale

Une endonucléase a été identifiée dans des extraits de noyaux de cellules infectées qui ne semble pas être présente dans les extraits de cellules non infectées. Cette activité enzymatique est retrouvée dans des préparations purifiées de virions, soit parce que l'enzyme constitue l'une des parties constituantes de la particule virale, nécessaire à son infectivité, soit parce qu'il présente une affinité élevée pour l'ADN viral et reste associé à celui-ci au cours de la maturation du virus.

Certaines propriétés de cet enzyme ont été étudiées :

1) des expériences de compétition avec de l'ADN hétérologue ont permis d'établir que l'affinité de l'enzyme pour l'ADN de polyome est environ 100 fois supérieure à son affinité pour l'ADN d'*Escherichia coli* ou un polymère synthétique (poly dA.dT) ;

2) l'enzyme n'effectue qu'une coupure endonucléolytique par chaîne dans l'ADN viral (deux coupures par molécule) ;

3) cette activité enzymatique a été observée dans une série de préparations indépendantes de virus de type sauvage et des variants « Grande Plage » et « Petite Plage ». Elle est également présente à un niveau normal chez un mutant thermosensible précoce du virus (ts-3). Cependant, on n'observe aucune activité associée aux virions dans le cas d'un autre mutant thermo-

sensible (ts-A) qui appartient à un groupe de complémentation différent. Cette observation suggère une relation entre le produit du gène viral correspondant et cette endonucléase, relation que le travail actuel vise à préciser.

L'ensemble des propriétés de cet enzyme correspond à celles qu'on peut attendre d'un enzyme impliqué dans les processus d'intégration du génome viral dans le génome cellulaire. Mais le seul critère définitif pour l'attribution au produit d'un gène viral d'une activité enzymatique serait l'observation d'une protéine modifiée (thermolabile) pour un mutant thermosensible du virus.

#### *B. - Séparation des protéines nouvelles synthétisées dans une cellule infectée ou transformée de l'ensemble des protéines cellulaires*

Le problème de l'isolement d'un petit nombre de protéines d'information virale parmi un nombre élevé de protéines cellulaires semble pouvoir être résolu, même sur les quantités limitées de matériel disponible, par une méthode simple et spécifique.

Deux types d'antisérum ont été préparés, l'un dirigé contre les protéines nucléaires de fibroblastes normaux de souris, l'autre contre les protéines nucléaires extraites pendant une infection par le polyome.

##### *a) Gels d'électrophorèse en plaques*

Cette technique permet de comparer 25 échantillons dans des conditions identiques de migration. La résolution des bandes de protéines est de 10 fois supérieure à celle obtenue avec les électrophorèses classiques en disques. Les bandes radioactives sont révélées par autoradiographie, ce qui augmente considérablement la précision et la sensibilité de la détection.

L'analyse en plaque de gel d'acrylamide d'un extrait protéique nucléaire de cellules infectées, purifié par immunoabsorption sur un sérum anti-protéines nucléaires normales, montre 4 bandes radioactives dont les poids moléculaires sont approximativement de 70 000, 24 000, 22 000 et 10 000.

Ces fractions non retenues sur immunoabsorbant pourraient correspondre à des protéines dont la synthèse est déréprimée ou induite par l'infection virale.

##### *b) Immuno-diffusion*

On a utilisé la technique mise au point par Oudin, de diffusion double en tubes et en cuves parallèles. Nous avons pu mettre en évidence :

1) l'apparition d'un antigène synthétisé en grandes quantités dans les cellules infectées par le polyome. Cet antigène est révélé avec le sérum anti-protéines nucléaires normales, ce qui indique qu'il préexiste mais en quantité indécélable (par les techniques immunologiques) dans les cellules normales ;

2) une identité complète entre les antigènes des cellules fibroblastiques de souris en culture primaire (MK) ou en lignée continue (3 T 3, 3 T 6...).

De plus, le sérum anti-protéines nucléaires de cellules de *souris* infectées par le polyome réagit avec les cellules de *hamster* transformées par le polyome, alors qu'il n'existe pas de réactions croisées entre le sérum anti-souris normal et les cellules de hamster.

Ce nouvel antigène pourrait être spécifique de la transformation par le polyome.

Enfin, un troisième antiserum a été préparé, dirigé spécifiquement contre le virus du polyome (F. Cuzin, D. Blangy, D. Paulin, C. Ebersolt, P. Rouget, N. Acheson, A. Parodi, R. Whalen, D. Piedra).

#### PUBLICATIONS

A. RYTER, Y. HIROTA et U. SCHWARZ, *On the process of cellular division in Escherichia coli. VIII. The growth pattern of E. coli murein* (*J. Mol. Biol.*, sous presse).

M. RICARD et Y. HIROTA, *Effet des sels et autres composés sur le phénotype de mutants thermosensibles d'E. coli* (*Ann. Microbiol* (Institut Pasteur), 1973, t. 124 A, p. 29-43).

— *On the process of cellular division in Escherichia coli. IX. Thermosensitive mutants defective in cell division ; morphology and genetics* (*J. Bact.*, sous presse).

— *On the process of cellular division in Escherichia coli. X. Thermosensitive mutants defective in cell division ; a physiological study* (*J. Bact.*, sous presse).

Y. HIROTA, M. GEFTER et L. MINDICH, *A mutant of Escherichia coli defective in DNA polymerase II activity* (*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1972, t. 69, p. 3238-3242).

M. GEFTER, T. KORNBERG, I. J. MOLINEUX, H. G. KHORANA, L. MINDICH et Y. HIROTA, *Studies on DNA polymerases II and III of Escherichia coli* (*Steenbock Symposium « DNA synthesis in vitro »*, sous presse).

A. RAMBACH, *Replicator mutants of bacteriophage lambda. Characterization of two subclasses* (*Virology*, sous presse).

— *Sur la réplication du bactériophage lambda* (Thèse de Doctorat présentée le 30 janvier 1973).

S. MILLET et A. RYTER, *Mutants de B. subtilis Marburg bloqués tardivement dans leur sporulation* (*Ann. Inst. Pasteur*, 1972, t. 122, p. 395-406).

J.-P. BOURGEOIS, A. RYTER, A. MENEZ, P. FROMAGEOT, P. BOQUET et J.-P. CHANGEUX, *Localization of the cholinergic receptor protein in Electrophorus electricus electroplax by high resolution autoradiographie* (*FEBS Letters*, 1972, t. 25, p. 127-133).

A. RYTER et Ph. BENDA, *Etude au microscope électronique d'hybride de cellules gliales et de fibroblastes* (*Exp. Cell. Res.*, 1972, t. 74, p. 407-416).

A. RYTER, *Growth of the murein layer in E. coli* (John Innes Symposium on « The generation of sub-cellular structures », sous presse).

— *Etude autoradiographique sur l'état de réplication des noyaux du sporange et de la spore chez B. subtilis* (*Ann. Inst. Pasteur*, sous presse).

J.-C. BENICHOU et A. RYTER, *Mise au point de la technique de coupes à congélation pour les bactéries Gram + et Gram —* (*J. Microscopie*, sous presse).

J.-C. BENICHOU, *Modifications apportées au cryo-ultramicrotome Sorvall* (*J. Microscopie*, sous presse).

A. MONNERON, *Membrane localized enzymes in calf thymocytes. A cytochemical demonstration of a 3'-nucleotidase and a NADP and UDPG phosphatase at the surface of cells* (*Biochem. Biophys. Acta*, Biomembranes, sous presse).

— *One step isolation, biochemical and cytochemical characterization of nuclear membranes* (*Proc. Roy. Soc.*, sous presse).

J.-P. BOURGEOIS, J.-L. POPOT, A. RYTER et J.-P. CHANGEUX, *Consequences of denervation on the distribution of cholinergic sites in Electrophorus electricus electroplax* (*Brain Res.*, sous presse).

J.-P. THIRION et M. HOFNUNG, *On some genetic aspects of phage lambda resistance in E. coli K12* (*Genetics*, 1972, t. 71, p. 207-216).

H. JAKOB et F. JACOB, *Recherche de « phénants » producteurs de glutamine-synthétase à partir d'une lignée de myélome de souris* (*C. R. Acad. Sci.*, 1972, t. 275, p. 1539-1542).

R.-M. FAUVE et B. HEVIN, *Immunostimulation. I. Actions comparées d'une endotoxine bactérienne et de la formaldéhyde sur les macrophages de souris* (C. R. Acad. Sci., sous presse).

F. CUZIN, *Les mutants du virus du polyome* (Bull. Cancer, 1972, t. 59, p. 15-20).

F. CUZIN, P. ROUGET et D. BLANGY, *Endonuclease activity of purified polyoma virus*. In « Possible episomes in eukaryotic cells » (Proc. of the 4th Lepetit Colloquium, L. G. Silvestri ed., North-Holland, 1973, sous presse).

D. BLANGY, R. DULBECCO, M. HASS et M. VOGT, *Integration of viral DNA in transformed cells* (25th Annual Symposium on Fundamental Cancer Research, « Molecular studies in viral neoplasia », 1972, Houston, Texas, sous presse).

D. BLANGY, *Intégration et transcription du génome viral dans les cellules transformées par les virus oncogènes à ADN* (Association canadienne française pour l'Avancement des Sciences, Ottawa, 1972, sous presse).