

# 3<sup>e</sup> ECOLE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Tome II

DU 29 MARS AU 3 AVRIL 1982

ALGER (Palais des Nations)

COMITE SCIENTIFIQUE PERMANENT :

F. BEN HAMIDA (Paris)  
G. BEAUD (Paris)  
F. CHAPEVILLE (Paris)  
P. COZZONE (Marseille)  
J.P. EBEL (Strasbourg)  
R. ELLOUZE (Sfax)

F. GROS (Paris)  
M. GRUNBERG-MANAGO (Paris)  
T. KAZI AOUL (Alger)  
G. LEFRANC (Monastir)  
M. MARRAKECHI (Tunis)  
B. TAYEBI (Alger)



## SOMMAIRE

### A- EXPOSES GENERAUX

- Le virus de la vaccine. Régulation des synthèses protéiques dans les cellules infectées et le virus de la vaccine comme vecteur de gènes exogènes.  
BEAUD G., BEN HAMIDA F., DRU A., LEMIEUX R., PERSON A. et VASSEF A. ... 11
- Expression des fonctions différenciées dans les cellules en culture. Résurgence et régulation de la synthèse du glycogène dans les cellules d'hépatôme de zadjela.  
FECK J.P., FLAIG-STAEDEL C. ... 17
- Le rôle des interactions idiotypiques des anticorps et des récepteurs cellulaires dans le maintien de l'activité du système immunitaire et dans sa régulation.  
CAZENVE P.A. ... 41
- Mécanisme de synthèse des neuropeptides du système nerveux central.  
COHEN P., CAMIER M., LAUBER M., NICOLAS P., GARNIER D., MOREL A., MASSE M.J.O., BOUSSETTA H., BEGUIN P. ... 47
- Polymorphisme et fonction biologique du complexe HLA.  
DAUSSET J. ... 61
- Bases structurales de la spécificité des réactions d'aminocyclation des t-RNA.  
EBEL J.P. ... 69
- Analyse de l'ADN et diagnostic moléculaire en génétique humaine: exemple des hémoglobinopathies.  
GOOSSENS M. ... 75

- Approche moléculaire à l'étude de la différenciation des cellules nerveuses.  
GROS F., CROIST B., PORTIER M.M., BERTHELOT F. ... 81
- Comparaison des produits de traduction et des modalités d'expression d'ARNs viraux dans les systèmes in vitro et in vivo.  
HAENNI A.L., JOSHI S., MORCH M.D. ... 87
- Analyse des gènes codant pour les antigènes de transplantation de classe I chez la souris.  
KOURILSKY P. ... 103
- Le transport transmembranaire des cations sodium, potassium et calcium: leur rôle dans la génération des potentiels d'action, dans les couplages excitation-contraction et excitation-sécrétion et dans la régulation du pH intracellulaire.  
LAZDUNSKI M. ... 109
- Virus oncogènes et gènes cellulaires proto-oncogènes, rôle dans la transformation cellulaire.  
MONIER R. ... 113
- Etude des éléments régulateurs de la transcription du gène précoce de SV<sub>40</sub>.  
MOREAU P., HEN R., EVERETT R., GAUB M.P., CHAMBON P. ... 117
- Biogénèse des mitochondries et contrôle de la réplication de leur DNA au cours de l'ovogénèse de *Xenopus Laevis*.  
MOUNOULO J.C., BARAT M., TOURTE M., CALLEN J.C., MIGNOTTE B. ... 123
- Neurotoxines de scorpion et canaux sodium des membranes excitables.  
ROCHAT H. ... 127

- L'expression normale et pathologique du gène de la thyroglobuline.  
 VASSART G., BROCAS H., CHRISTOPHE D., MARTINOFF G.D.,  
 LERICHE A., MERCKEN L., POHL V., VAN HEUVERSWIJN B. ... 131
- Photoproduction d'hydrogène par les bactéries photosynthétiques  
 VIGNAIS P.M. ... 143
- Aspects moléculaires et physiologiques du transport de l'ATP et de l'ADP dans les membranes de mitochondries.  
 VIGNAIS P.V. ... 153
- Biogénèse des ribosomes dans les cellules CHO.  
 ZALTA J.P., BOUCHE G., BULGER B., CAIZERGUES-FERRER M.,  
 AMALRIC F. ... 159
- Organisation du génôme des picornavirus, clonage moléculaire du poliovirus.  
 GIRARD M., KOPECKA H., VAN der WERF S., DREANO M. ... 161
- Utilité de la microscopie électronique dans l'étude de problèmes en biologie moléculaire, en particulier dans celle des protéines membranaires.  
 KELLENBERGER E. ... 167
- Le butyrate de sodium, outil pharmacologique en biologie moléculaire.  
 KRUIH J. ... 175
- Régulation transcriptionnelle et post transcriptionnelle chez les eucaryotes au niveau des RNA messagers et pré-messagers.  
 SCHERRER K. ... 189

- Propriétés et relations structurales et immunologiques des ARN polymérases de levure.  
SENTENAC A., HUET J., LESCURE B., SAWADOGO M., FROMAGEOT P. ... 207
- Perspectives du génie enzymatique.  
THOMAS D. ... 213

B- COMMUNICATIONS ET POSTERS

- Relation entre la glycolyse et la néoglucogénèse au cours du jeûne. Possible rôle de la pyruvate kinase. Etude sur les hépatocytes isolés de rat.  
AZZOUT B., DELHOMME B., PERET J. ... 219
- Comportement des acides aminés silylés sur une phase de polyméthylsiloxane greffée au verre  
BOUCHAGRA T., TAYEBI B. ... 221
- Essai de purification de la streptomycine et de la néomycine par H.P.L.C.  
BOUCHAGRA T., TAYEBI B. ... 225
- Essai des promoteurs de tumeurs sur le capping induit par la concanavaline A des récepteurs de thymocytes chez la souris.  
CHERIF ZAHAR C., CASTAGNA M. ... 227
- Energétique de la croissance des microorganismes en aérobiose. Application de la microcalorimétrie à l'étude de la cellulolyse.  
DERMOUN Z., BELAICH J.P. ... 231
- Evaluation immunoenzymatique de la fibronectine sur une culture organotypique en présence de caféine et de théobromine.  
KANE A., CHAVERON H., SIGOT LUIZARD M.F., SIGOT M. ... 245

- Isolement et caractérisation des ARN messagers de l'antithrombine et de l'alpha-2 Macroglobuline.  
NTYANE MANDOUA E. ... 243
- Reconnaissance du tRNA<sup>trp</sup> amorce par la DNA polymérase du virus de la myeloblastose aviaire (transcriptase réverse).  
SARIH L., LITWAK S. ... 251
- Atteinte métabolique rénale chez le rat des sables diabétique (Psammomis obesus).  
BENZAOUG Y., HADJIKSKY P., MARQUIE G. ... 255
- Aspects génétiques et biochimiques dans l'ostéogenésis imperfecta.  
BORSALI F., HERBAGE D., BUFTEVANT Ch., MEZIAN F., BENDOUMA M., AGERSIF M. ... 259
- Purification d'un complexe multienzymatique renfermant sept aminoacyl-t-RNA synthétases à partir de réticulocytes de lapin.  
ELLOUZE S., PAILLEIZ J.P., WALLER J.P. ... 265
- Action d'un inhibiteur de phosphatases ( $\text{MoO}_4^{--}$ ) sur le complexe cytosolique spécifique glucocorticoïde-Récepteur.  
LESENEY A.M., BEFORT J.J., BENMILOUD M. ... 267
- Etude des modifications enzymatiques aortiques chez le rat des sables diabétique (Psammomis obesus)  
MAHTOUT S., HADJILSKY P., MARQUIE G. ... 269
- Les sous populations de cellules B répondant aux mitogènes expriment sélectivement différents marqueurs des régions variables.  
MAMI F., PRIMI D., LE GERN C., CAZENAVE P.A. ... 273

- Analyse clinique, génétique et biochimique des bêta thalassémies associées à l'hémoglobine S en Algérie.  
MORLE L., MORLE F., TALEB BENDIABR., BOUHASS R., AGERSIF M. ... 277
- Effet correcteur in vitro de l'iduronate sulfatase urinaire, partiellement purifiée, sur des fibroblastes de sujets atteints de maladie de Hunter. Comparaison avec son activité catalytique.  
ZENATI A., LIEBAERS I., MOKHATRI S., EL-MOKHEFI Z.,  
YOUCEF KHODJA S., BERHOUNE A. ... 283

C- ADDITIF

- Etude de l'activité lipolytique des adipocytes chez les rats des sables (Psammomys obesus)  
DAHMANI Y., TABET-AOUL M., DUFOUR P., MARQUIE G. .... 297
- Multiples formes moléculaires de l'aphosphatase alcaline dans le cerveau de fœtus de veau.  
MAZA A. .... 299
- Ponction, aspiration et dosage des récepteurs hormonaux dans le cancer du sein.  
MAGDALENAT H., BENYAHIA B. ... 301

**EXPOSES      GENERAUX**

# LE VIRUS DE LA VACCINE . REGULATION DES SYNTHESES PROTEIQUES DANS LES CELLULES INFECTEES ET LE VIRUS DE LA VACCINE COMME VECTEUR DE GENES EXOGENES .

G.BEAUD, F.BEN-HAMIDA, A.DRU, R.LEMIEUX<sup>+</sup>, A.PERSON et A.VASSEF  
Institut de Recherche en Biologie Moléculaire  
du CNRS et de l'Université de Paris 7.Tour 43.  
2, Place Jussieu 75251 PARIS CEDEX 05. FRANCE .

+ Adresse actuelle : Département of Biochemistry,Mc Gill University, Montreal  
Quebec H3G 1YG, CANADA.

## I. LE VIRUS DE LA VACCINE

Le virus de la vaccine (1,2,3) appartient au groupe des poxvirus qui sont définis par les caractères suivants : (a) virion de grande taille à morphologie typique en forme de brique (270x218 nm) et de structure complexe, (b) l'acide nucléique est constitué par du DNA double brin (vaccine : 125 x 10<sup>6</sup> ou 180 kb), (c) l'expression des gènes et la replication du DNA s'effectuent dans le cytoplasme mais une fonction nucléaire dont la nature est inconnue est nécessaire pour obtenir des virions normalement assemblés (4,5,6), (d) les orthopoxvirus ont un antigène commun : il comprennent le virus de la vaccine et celui de la variole. La vaccination de l'homme par le virus de la vaccine a permis l'éradication de la variole (7). La clavelée est un poxvirus pathogène pour les ovins.

Le virus de la vaccine est le virus le plus étudié des poxvirus et son étude a permis en 1967 de montrer pour la première fois qu'une transcriptase (RNA polymerase) peut être un constituant d'un virus animal (8,9). L'utilité de ce virus pour des études fondamentales provient de ce que : (a) il s'agit d'un virus qui peut être obtenu facilement à l'état purifié en assez grandes quantités (20 mg au moins), (b) il présente un développement très synchrone, (c) son développement cytoplasmique permet une étude de la transcription des gènes viraux sans avoir le bruit de fond de la transcription (cellulaire) nucléaire, (d) son développement cytoplasmique implique que les enzymes effectuant la transcription et la replication du DNA viral sont codées par le génome viral.

Les étapes du développement du virus de la vaccine sont brièvement rappelées (ci-dessous). L'adsorption du virus de la vaccine ne semble pas impliquer de sites cellulaires spécifiques de la membrane. Le DNA viral parental est injecté ensuite à l'état d'une sous particule virale (nucléotide ou "core") qui contient environ 50% des protéines du virion. Ces protéines contiennent environ quinze activités enzymatiques dont la moitié concerne la transcription précoce (qui se produit avant la réplication du DNA) et qui aboutit à l'expression de la moitié du génome viral (environ une centaine de séquences d'environ 1000 nucléotides). Ces mRNA précoces sont transcrits, modifiés à leur extrémité 5'-terminale ("capping") et 3'-terminale (poly= adénylation) par des enzymes (sans doute codées par le virus) qui sont associées aux cores ; ils sont ensuite détachés des particules virales et traduits en protéines du type précoce. Le rôle d'autres enzymes associées aux cores est encore inconnu (topoisomérase, 2 ATPase-DNA dépendentes, 2 DNAases protéine kinase ; la protéine kinase participe à l'établissement du blocage des synthèses protéiques (voir plus bas). Il est possible d'obtenir *in vitro* des sous particules similaires et contenant 70% des protéines virales en traitant les virions purifiés par un détergent non-ionique en milieu réducteur ce qui démasque l'activité des enzymes associées aux cores. Ces enzymes ont été solubilisées et purifiées. Il est important de remarquer que l'injection des cores dans le cytoplasme (1ère décapsidation) ainsi que la synthèse des mRNA précoces peuvent se produire en l'absence de synthèse protéique. La deuxième décapsidation requiert

par contre une synthèse de protéines précoces : elle aboutit à une plus grande déprotéinisation du DNA parental et coïncide avec la transcription d'un faible nombre de nouvelles espèces de mRNA précoces ("delayed early"). On observe ensuite la replication du DNA parental et la transcription de la totalité du génome ce qui aboutit à l'apparition des mRNA et protéines du type tardif. L'assemblage du virion est complexe et il semble exister un mécanisme de transport pour la dissimulation du virus. Pour la plupart des souches de vaccine l'infection des cellules en monocouche se fait pratiquement sans libération de virus dans le milieu de culture par passage de cellule à cellule; certaines souches de vaccine excrètent des quantités importantes de virions qui sont alors enveloppés.

Il est clair que la transcription des gènes précoces et tardifs est le facteur principal qui commande l'apparition des protéines virales. Ceci pose néanmoins deux problèmes quant à la traduction des mRNA viraux car : (a) observe un blocage des synthèses protéiques cellulaires concomittant à la traduction des mRNA précoces, (b) à l'étape tardive les mRNA précoces ont été accumulés mais ne sont plus traduits alors que les séquences tardives sont alors exprimées.

## II. REGULATIONS DES SYNTHÈSES PROTÉIQUES DANS LES CELLULES INFECTÉES PAR LE VIRUS DE LA VACCINE.

### II.a. Blocage de la synthèse protéique cellulaire à l'étape précoce .

Il convient de rappeler que la plupart des virus cytopathiques provoquent un blocage de la synthèse protéique cellulaire, concomittant à la traduction des mRNA viraux. Dans le cas du poliovirus et des mRNA (tardifs) du réovirus, qui ne sont pas cappés à leur extrémité 5' terminale, il a été suggéré que les mRNA cellulaires (qui sont cappés) ne sont plus traduits suite à une modification, induite par l'infection virale, du système de traduction (inactivation de certains facteurs d'initiation requis pour la traduction des mRNA cappés). Un tel modèle ne semble pas pouvoir s'appliquer au cas des mRNA précoces de la vaccine qui sont cappés ; de plus ces mRNA viraux ne présentent pas une affinité plus grande pour être traduits que celle des mRNA du type cellulaire (10,11) et il n'a pas été possible de mettre en évidence une discrimination en faveur de la traduction *in vitro* des mRNA précoces de la vaccine dans des lysats dérivés de cellules de tumeurs d'ascite d'Ehrlich (EAT) infectées à l'étape précoce par le virus de la vaccine, souche Copenhagen (11). Les mRNA cellulaires ne sont plus détectables à 2-3 heures après infection mais des quantités importantes (sinon la totalité) sont toujours présentes à 1 heure après infection. Il est possible que cette inactivation (ou dégradation) des mRNA cellulaires soit la conséquence plutôt que la cause du blocage des synthèses protéiques cellulaires car un marquage préférentiel des protéines virales est détecté dans les premières minutes après infection des cellules EAT après infection par le virus de la vaccine (résultats non publiés). Pour une part cette traduction préférentielle des mRNAs viraux pourrait résulter d'une traduction se produisant sans attachement préalable du mRNA viral au cytosquelette. En effet les travaux des groupes de Porter (12) et de Penman (13,14) suggèrent fortement que les polysomes (non associés aux membranes) sont attachés à une structure, encore mal définie du cytosquelette et ne sont donc pas "libres" ou en solution dans le cytosol. Nous avons pu confirmer les résultats du groupe de Penman dans le cas des mRNA cellulaires des cellules EAT. Par contre au moins 40% des mRNA précoces de la vaccine sont apparemment traduits *in vivo* sans être associés au cytosquelette et ceci en l'absence de dégradation détectable de la structure du cytosquelette après infection par le virus de la vaccine (15).

Un autre facteur contribuant à la sélectivité de la traduction des mRNA précoces pourrait résulter de la présence d'un inhibiteur des synthèses protéiques associé au virus. Nous avons mis en évidence cet inhibiteur, qui agit au niveau de l'initiation, dans les cellules EAT infectées par le virus de la vaccine

et exposées à la 3'-déoxy-adénosine, qui inhibe la transcription et la synthèse de poly(A) viraux (16). Nous avons pu mettre en évidence la présence de cet inhibiteur dans les sous-particules purifiées isolées des virions (17). Plus récemment, nous avons pu montrer que cet inhibiteur peut être solubilisé au cours d'une réaction protéine-kinase in vitro après incubation de virions purifiés en présence de NP40,  $Mg^{++}$ , DTT et ATP. Les protéines qui sont phosphorylées in vitro et détachées des particules virales à pH alcalin migrent après électrophorèse avec un  $M_r$  d'environ 11K (18). Les propriétés de l'inhibiteur de la synthèse protéique que nous avons obtenu sous une forme partiellement purifiée suggèrent fortement qu'il s'agit d'une (ou plusieurs) protéines du virus phosphorylée(s) par la protéine kinase associée aux cores (19). Cet inhibiteur partiellement purifié bloque la formation du complexe d'initiation 40S-Met-tRNA<sub>f</sub> (19). La spécificité de cet inhibiteur dans le blocage de la synthèse protéique cellulaire pourrait résulter de la synthèse d'une protéine virale produite très rapidement après infection (20).

### II.b. Régulation de la traduction à l'étape tardive :

En traduisant in vitro les ARN cytoplasmiques isolés des cellules EAT infectées par le virus de la vaccine (5-6 heures), nous avons montré la présence de plusieurs mRNA précoces alors que ces mRNA ne sont plus traduits dans les cellules infectées correspondantes (21). Il s'agit donc d'un cas typique de régulation de la traduction des mRNA. Nous avons montré (par compétition pour l'hybridation au DNA viral) que ces cellules contiennent de grandes quantités de séquences proprement précoces, dont la plupart ne sont pas traductibles in vitro. Ces résultats suggèrent que l'inactivation des mRNA précoces se produit comme conséquence de la réduction de la traduction des mRNA précoces à l'époque tardive. Une observation similaire a été faite indépendamment par d'autres auteurs, dans le cas du mRNA codant pour la thymidine kinase (22).

### III. MISE AU POINT DU VIRUS DE LA VACCINE COMME VECTEUR DE GENES EXOGENES.

L'intérêt de ce projet est au niveau fondamental, de permettre une étude de l'expression cytoplasmique de gènes exogènes et en particulier de définir le type de promoteurs reconnus par le système de transcription cytoplasmique viral. Ces recherches fondamentales seraient susceptibles d'applications pratiques puisque l'insertion de gènes exogènes qui s'expriment permettrait d'obtenir des vaccins vivants peu coûteux. Ces deux aspects justifient le but d'obtenir un nouveau vecteur dérivé du virus de la vaccine puisque les vecteurs eucaryotes (cellules animales), déjà mis au point, sont dérivés de virus oncogènes et sont transcrits dans le noyau des cellules.

A priori la mise au point d'un vecteur vaccine peut s'effectuer en recombinant in vitro le DNA exogène au DNA vaccine et en procédant ensuite à des expériences du type "transfection", c'est à dire en utilisant comme agent infectieux le DNA recombiné in vitro, avec virus helper. Cependant, il nous paraît difficile de construire in vitro un tel DNA étant donné sa taille ( $125 \times 10^6$ ). C'est la raison pour laquelle le projet repose sur la technique du sauvetage du marqueur. Le principe de ces expériences est de sélectionner les recombinants formés dans les cellules infectées par un mutant du virus vaccine par recombinaison in vivo avec un fragment de DNA vaccine (du type sauvage) qui pénètre dans les cellules dans certaines conditions expérimentales (23). L'intégration de DNA exogène devrait s'effectuer dans le cas où ce dernier a été inséré au préalable dans le fragment de DNA vaccine utilisé pour la recombinaison par homologie vaccine. Dans le cas où le DNA exogène est inséré dans le gène codant pour la thymidine kinase (TK), on peut penser que ce gène non essentiel sera inactivé, ce qui permettra de sélectionner les recombinants obtenus en milieu contenant de la BUdR (l'infection étant réalisée dans des cellules TK<sup>-</sup> par de la vaccine TK<sup>+</sup>). A cet effet, nous avons confirmé que le fragment J/Hind III du DNA vaccine

doit contenir le gène TK (B. Moss et R. Condit, communications personnelles; résultats non publiés) puisqu'il est possible d'obtenir des recombinants TK<sup>+</sup>, sélectionnés en milieu HAT, dans des cellules TK<sup>-</sup> infectées par un mutant vaccine TK<sup>-</sup> exposées au fragment J/Hind III (3,2 x 10<sup>6</sup>), cloné dans pBR322 et portant le marqueur TK<sup>+</sup>. Nous avons fait la cartographie des sites d'une dizaine d'enzymes de restriction qui clivent le fragment J/Hind. Les enzymes qui clivent le DNA près du site de mutation qui a produit le mutant TK<sup>-</sup> doivent inactiver la capacité de sauver le marqueur : nous avons pu ainsi définir le site de la mutation TK<sup>-</sup> sur le fragment J/Hind III (résultats non publiés). Cette étude nous permettra de définir les sites de restriction très probablement présents dans le gène TK, qui code pour une chaîne protéique de 48 K environ et de procéder à l'insertion de DNA exogène comme indiqué plus haut. Nous projetons d'isoler ensuite des fragments de DNA vaccine qui contiennent une activité promoteur, afin de permettre l'expression du DNA exogène intégré dans le virus de la vaccine.

## REFERENCES

1. MOSS, B. (1978). The poxviruses. In the Molecular Biology of Animal Viruses. D.P. NAYAK, Ed. pp. 849-890. M. Dekker, Inc. N.Y.
2. WOODSON, B. (1968). Recent progress in Poxvirus research. *Bacteriol. Rev.*, 32, 127-137.
3. DRILLIEN, R. (1979). Nouvelles données sur les poxvirus. *Biochimie* 61, n°10, pp VII-XI.
4. HRUBY, D.E., GUARINO, L.A. & KATES, J.R. (1979). Vaccinia virus replication. I. Requirement for the host-cell nucleus. *J. Virol.* 29, 705-715. Voir aussi: HRUBY et al. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 1887-1890.
5. SILVER, M., Mc FADDEN, G., WILTON, S. & DALES, S. (1979). Biogenesis of Poxviruses : role for the DNA-dependent RNA-polymerase II of the host during expression of the late functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4122-25.
6. POTHIER, P., DRU, A. & BEAUD, G. (1981). The inhibition of vaccinia virus replication by 5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) : an effect at the assembly stage. *J. Gen. Virol.* 55, 87-94.
7. ARITA, I. (1979) - Virological evidence for the success of the small pox eradication programm. *Nature* 279, 293-298.
8. KATES, J.R. & Mc AUSLAN, (1967). Messenger RNA synthesis by a "coated" viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57, 314-320.
9. MUNYON, W., PAOLETTI, E. & GRACE, J.T.. (1967). RNA polymerase activity in purified infections vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 58, 2280-2288.
10. COOPER, J.A. & MOSS, B. (1979) - *In vitro* translation of immediate early, early and late classes of RNA from vaccinia virus-infected cells. *Virology* 96, 368-380.
11. LEMIEUX, R., VASSEF, A., BEN-HAMIDA, F. & BEAUD, G. (1982). Expression of vaccinia virus early mRNA in EAT cells. I. Translation of cellular and viral early mRNA in cell-free systems from uninfected and virus early infected cells. En préparation.
12. WOLOSEWICK, J.J. & PORTER, K.R. (1976). Stereo high-voltage electron microscopy of whole cells of the human diploid line, WI-38. *Am. J. Anat.*, 147, 303-324.
13. LENK, R., RANSOM, L., KAUFMAN, Y. & PENMAN, S. (1977). A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells. *Cell* 10, 67-78.
14. CERVERA, M., DREYFUSS, G. & PENMAN, S. (1981). Messenger RNA is translated when associated with the cytoskeletal framework in normal and VSV-infected HeLa cells. *Cell* 23, 113-120.
15. LEMIEUX, R. & BEAUD, G. (1982). Expression of vaccine virus early mRNA in Ehrlich ascites tumor cells. II. Part of viral polysomes are not bound to the cytoskeleton. In preparation.
16. PERSON, A. & BEAUD, G. (1978). Inhibition of host protein synthesis in vaccinia virus-infected cells in the presence of cordycepin (3'-deoxyadenosine). *J. Virol.* 25, 11-18.
17. BEN-HAMIDA, F. & BEAUD, G. (1978). *In vitro* inhibition of protein synthesis by purified cores from vaccinia virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75, 175-79.

- BIBLIOTHEQUE DU CERIST
18. SAGOT, J. & BEAUD, G. (1979). Phosphorylation *in vivo* of a vaccinia-virus structural protein found associated with the ribosomes from infected cells. *Eur. D. Biochem.* 98, 131-140.
  19. BEN-HAMIDA, F., PERSON, A. & BEAUD, G. (1982). Solubilization and properties of protein synthesis inhibitor from vaccinia virus. *Soumis pour publication*.
  20. BEAUD, G. & DRU, A. (1980). Protein synthesis in vaccinia virus-infected cells in the presence of amino acid analogs : a translational control mechanisms. *Virology* 100, 10-21.
  21. VASSEF, A., BEN-HAMIDA, F., DRU, A. & BEAUD, G. (1982) - Translational control of early protein synthesis at the late stage of vaccinia virus infection. *Virology*, in the press.
  22. HRUBY, D.E. & BALL, L.A. (1981). Control of expression of the vaccinia virus thymidine kinase gene. *J. Virol.* 40, 456-464.
  23. STOW, D.N. & WILKIE, N.M. (1976). An improved technique for obtaining enhanced infectivity with herpes simplex virus type 1 DNA. *J. Gen. Virol.* 33, 447-458.

EXPRESSION DES FONCTIONS DIFFERENCIÉES  
DANS LES CELLULES EN CULTURE  
RESURGENCE ET REGULATION DE LA SYNTHÈSE DE  
GLYCOGÈNE DANS LES CELLULES D'HEPATOME DE ZAJDELA

J.P. BECK et C. FLAIG-STAEDEL

Institut de Physiologie et de Chimie Biologique, Université Louis Pasteur,  
67084 - STRASBOURG Cedex - FRANCE

GENERALITES

Les cultures de cellules animales "in vitro" se sont avérées un matériel de choix pour aborder la Physiologie à un niveau cellulaire et moléculaire. En effet, de par leur simplicité constitutive et fonctionnelle, elles permettent de résoudre certains problèmes posés par l'expérimentation sur l'organisme entier, à savoir :

- 1) L'hétérogénéité cellulaire d'un organe d'animal adulte : les cultures sont en général constituées par des souches ou des lignées homogènes et permettent d'étudier les fonctions d'un type cellulaire particulier, et de vérifier dans quelles mesures les observations "in situ" sur des ensembles cellulaires complexes se retrouvent in vitro sur des cellules bien définies.
- 2) Les interactions multiples et complexes des différents types cellulaires d'un organisme, entre eux et avec les compartiments extracellulaires :

Ces relations sont à considérer sous un angle dynamique, autant dans l'organisme adulte en perpétuelle recherche d'un équilibre physico-chimique, que dans l'organisme en développement qui met en place un système enzymatique spécialisé. L'avantage de la culture de tissus a su être mis à profit dans les études, déjà très anciennes (1,2) sur la différenciation caractéristique d'un type cellulaire au cours de l'ontogénèse, indépendamment des autres éléments tissulaires d'un embryon. "In vitro", les interactions cellulaires sont limitées à celles établies d'une part avec les cellules voisines, qui sont du même type, et d'autre part avec le milieu environnant, dont la composition initiale et ses variations temporelles peuvent être constamment contrôlées par des dosages.

3) Les régulations homéostatiques, résultats de la réaction concertée d'une variété de tissus au sein de l'organisme, dans le but de s'opposer à l'action d'un stimulus externe sur la composition chimique du milieu intérieur :

Sur ce point, les systèmes de cultures cellulaires offrent un attrait certain pour étudier directement l'action d'effecteurs agissant au niveau des régulations tels que les hormones, les éléments nutritifs, les substances mutagènes et oncogènes, et pour décomposer les maillons du contrôle endocrinologique et nutritionnel, ainsi que ceux de la transformation génétique et néoplasique dans différents tissus-cibles. Pour le foie en particulier, les essais de cultures cellulaires se sont révélés très fructueux pour les recherches sur la physiologie de cet organe, siège de fonctions complexes et soumises à une régulation hormonale et nutritionnelle très élaborée.

Ainsi, les cultures cellulaires offrent certains avantages conceptuels et méthodologiques, grâce à la possibilité de contrôler de manière stricte le milieu environnant, et d'éliminer les causes indirectes, les interactions et rétroactions multiples qui existent dans l'organisme animal entier. Les systèmes de culture "in vitro" sont variés, et un grand nombre de types cellulaires ont été utilisés, dans de nombreuses conditions de croissance, dans le but de définir le système eucaryote idéal, analogue méthodologique des cultures de procaryotes pour l'étude de l'expression génétique et de sa régulation. Mais l'utilisation des cellules en culture "in vitro" présente encore deux limites essentielles qui ressortent de concepts fondamentaux de la biologie :

-La stabilité de l'état différencié de la cellule dans des conditions hors de l'organisme.

-L'importance de son micro-environnement physico-chimique.

Le nouveau micro-environnement déterminé par les conditions de culture in vitro fait subir progressivement aux cellules des modifications du contrôle de leur croissance et de celui de leur expression fonctionnelle.

Concernant le taux de croissance d'une cellule in vitro, l'évolution de ce paramètre au cours des transplantations successives a été décrite par HAYFLICK et MOOREHEAD (3) et représentée par le diagramme théorique suivant, où ces auteurs distinguent en outre la lignée de la souche cellulaire :

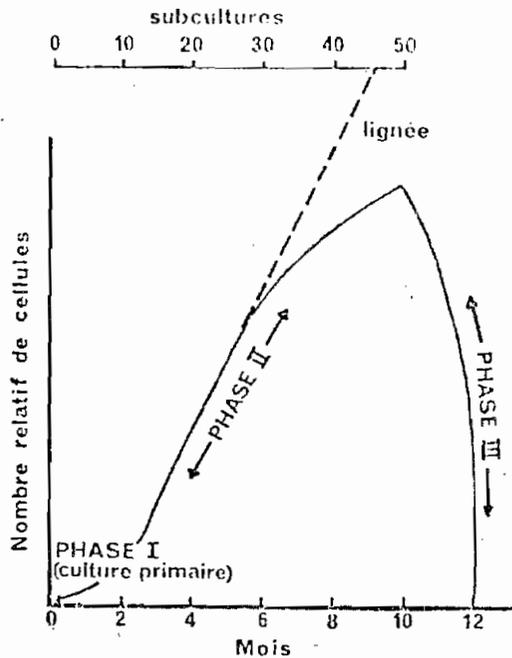


Figure 1 : Evolution théorique du taux de croissance cellulaire au cours des transplantations successives ( d'après HAYFLICK et MOOREHEAD, 3 )

a) La phase 1 représente la culture primaire, c'est-à-dire le premier passage des cellules "in vitro", qui s'achève par la formation de la première couche confluente. Dans cette phase, le pouvoir de division de la culture est faible.

b) Si cette culture peut être propagée au cours de nombreuses transplantations "in vitro", on parlera de souche, qui s'établit au cours de la phase II : cette seconde phase est caractérisée par une augmentation de l'activité mitotique.

c) Une altération cellulaire peut survenir à n'importe quel moment de cette seconde phase et donner naissance à une lignée cellulaire établie, dont le potentiel de croissance est théoriquement infini.

Au contraire, une souche cellulaire peut entrer en phase III, et dégénérer au bout d'un temps déterminé, et être définitivement perdue.

Au cours de l'établissement d'une lignée cellulaire peuvent apparaître des modifications drastiques dans la culture, de degré cependant variable selon les tissus. Un exemple de ce processus de "transformation cellulaire" concerne les fibroblastes de Souris (4) dans lesquels on observe :

- la perte de l'inhibition de croissance par contact cellulaire ;
- la capacité de se développer à un taux d'inoculation faible ;
- des modifications caryotypiques, l'hétéroploïdie et l'apparition de chromosomes anormaux ;
- des potentialités malignes et, injectés à un hôte adéquat, la capacité de développer une tumeur.

Ainsi, les modifications des propriétés de croissance au cours des transplantations successives "in vitro" impliquent souvent des variations génétiques et morphologiques et ne sont pas sans relation avec le problème de la carcinogénèse.

De même, des altérations enzymatiques plus discrètes surviennent fréquemment à la suite des premières divisions "in vitro" et au cours de l'adaptation cellulaire au nouvel environnement.

Les quelques exemples suivants précisent le degré de ces modifications, qui touchent vraisemblablement au contrôle de l'expression génétique.

COX et coll. (5) ont observé une diminution de la phosphatase alcaline dans des cultures primaires de cellules rénales humaines lorsqu'elles adhèrent au substrat, ainsi qu'un isozyme de la phosphatase alcaline de type foetal dans un ensemble de souches et lignées cellulaires.

EBNER (6), pour des cultures primaires en monocouche de cellules de glande mammaire bovine, a signalé une série de modifications biosynthétiques et enzymatiques en fonction du temps de culture : l'observation d'une diminution brusque dans la production de lactose et d'une perte progressive de la capacité de synthèse de la  $\beta$ -lactoglobuline a été imputée à une modification de l'expression génétique dans les conditions "in vitro".

WALKER (7), a montré que dans des cultures d'hépatocytes adultes, les isozymes de l'hexokinase, de l'aldolase et de la pyruvate-kinase ont des caractéristiques de type foetal. Egalement dans des cellules de foie, PADIEU (8) a mis en évidence des chutes importantes d'activité de la lactate deshydrogénase, de la phosphoglycérokinase et de la phosphohexomutase, et la disparition totale de la glucose-6-phosphatase au cours des premières subcultures. D'autres enzymes microsomaux, le cytochrome p450 et des enzymes métaboliques de drogues tendent à disparaître lors des premières mitoses dans les cellules hépatiques en culture (9), parallèlement à une dispersion du réticulum endoplasmique dans ces cellules.

Ainsi, la simplification structurale et fonctionnelle est un phénomène largement répandu dans les systèmes cellulaires isolés et la stabilité de la fonction différenciée est apparue comme exceptionnelle (10). Cependant, la disparition des fonctions spécifiques dans une cellule "in vitro" s'est avérée plus apparente que réelle : les investigations nouvelles et les perfectionnements dans les techniques de culture, ainsi que l'utilisation de cellules néoplasiques dérivées de tumeurs exprimant des fonctions différenciées, ont permis la propagation de cultures conservant un ou plusieurs caractères différenciés du tissu d'origine. L'importance des conditions de nutrition dans

le développement d'une culture cellulaire "in vitro" a déjà été soulignée par CARREL en 1912 (2) : grâce à un mélange adéquat d'éléments organiques il a réussi à maintenir en vie, pendant une période de plusieurs mois, des fragments de tissu conjonctif et de tissu cardiaque de jeunes poulets ; les cellules se multipliaient activement en périphérie du fragment tissulaire isolé, et après plusieurs mois dans ces conditions, les cellules cardiaques se sont remises à battre de façon rythmique. Quelques décennies plus tard, les besoins nutritifs des cellules en culture ont été définis par EAGLE (11) sur des fibroblastes et des cellules de carcinome cervical. Le mélange d'acides-amino, de vitamines, de sels, de source carbonée et de facteurs sériques que constitue le milieu de culture a été établi plus ou moins empiriquement ; il assure la stimulation de la croissance et la constance des caractères morphologiques et biochimiques propres à un type de cellule. Son rôle dans l'expression d'une fonction différenciée caractéristique du tissu d'origine a été mis en évidence par les expériences de CAHN et CAHN (12) sur les cellules rétiniennes pigmentaires, et par COON et COON (13) sur des cellules cartilagineuses en culture. Ces auteurs ont attribué le phénomène de différenciation des cellules en culture au caractère déficient ou inadéquat du milieu nutritionnel. Divers travaux (14,15) ont mis l'accent sur l'importance relative des paramètres liés aux conditions de culture, nécessaires pour maintenir "in vitro" l'activité physiologique cellulaire telle qu'"in vivo". Ces différents paramètres sont par exemple les conditions d'oxygénation (16), le pH du milieu (17), le volume des cellules inoculées par rapport au volume du milieu (18), les protéines sériques (19), des facteurs protéiques spécifiques d'une fonction cellulaire (hormones, nerve growth factor, érythropoïétine...) ou des effecteurs de petits poids moléculaires (analogue de cAMP, glutamine, arginine, glucose...).

Actuellement, les techniques de culture "in vitro" sont relativement perfectionnées pour permettre de maintenir les cellules hors de l'organisme animal dans un état diffé-

Tableau I : Expression de fonctions différenciées dans des cellules en culture ( \* )

TYPE CELLULAIRE	PRODUIT DE DIFFERENCIATION	REFERENCES
Muscle strié	Actomyosine, créatine-kinase	HOLTZER, 1972
Muscle cardiaque	Myosine, créatine-kinase	GOLDSTEIN, 1974
Muscle lisse	Elastine	ROSS, 1971
Chondrocyte	Chondroïtine sulfate, acide hyaluronique, $\alpha_1$ -collagène	HOLTZER, 1972
Erythroblaste	Hémoglobine	HOLTZER, 1972
Lymphoblaste	Immunoglobulines (cellules B), médiateurs de l'immunité cellulaire (cellules T)	BLOOM, 1973
Hépatocyte (adulte)	Induction de TAT par les glucocorticoïdes	GERSCHEMSON, 1970
Jonction neuro-musculaire	Neurotransmetteurs	ROBBINS et YONESAWA, 1971
Cellules de Sertoli	Spermatides	KONAOI, 1966

( \* ) d'après COX (20)

rencié, favorisant ainsi des investigations sur certains aspects de la régulation cellulaire. Le tableau I regroupe quelques exemples de fonctions différenciées conservées dans des conditions de culture "in vitro".

La difficulté d'établir "in vitro" une lignée cellulaire présentant une caractéristique physiologique spécifique et intéressante peut être contournée par l'utilisation de cellules tumorales, à caractère partiellement différencié. Celles-ci sont relativement plus faciles à maintenir et à propager en culture et leurs besoins nutritifs semblent moins stricts. Ce travail ayant été effectué sur une souche cellulaire d'origine néoplasique, il nous faut considérer brièvement et de façon générale les propriétés biologiques d'un tel type cellulaire. Les cellules cancéreuses, définies comme responsables du développement d'une tumeur maligne si elles sont injectées à l'animal, tendent vers des fonctions métaboliques uniformes, s'opposant ainsi à la diversité enzymatique des tissus normaux et sains (21) :

- a) Concernant le taux de croissance : il peut être variable dans le spectre des différents types tumoraux, mais de façon générale il est plus élevé que dans le tissu sain d'origine, suggérant une altération du contrôle de la mitose : il s'ensuit un taux accru de synthèse des acides nucléiques et des protéines totales.
- b) L'ultrastructure générale d'une cellule cancéreuse est différente du tissu sain, et présente une simplification plus ou moins avancée ; les organites cytoplasmiques et les structures cellulaires ont subi une altération (mitochondrie, noyau, membranes) ou tendent même à disparaître (réticulum endoplasmique).
- c) Le caryotype présente des anomalies chromosomiques et une hétéroploïdie.
- d) Le métabolisme glucidique constitue un exemple de reprogrammation de l'expression génétique dans les cellules tu-

morales. WARBURG (22) a observé une glycolyse uniformément élevée parmi tous les types de cellules cancéreuses, ainsi que la disparition de la fonction de néoglucogénèse et de glycogénogénèse.

L'importance de la glycolyse est en relation directe avec le taux de division de ces cellules, et, par l'intermédiaire du ribose et de NADH, elle assure la néosynthèse d'acides nucléiques. En outre, le contrôle de la fonction glycolytique est altérée, puisqu'elle présente une moindre dépendance vis à vis de l'oxygène.

e) Concernant les modifications enzymatiques et fonctionnelles, les cellules cancéreuses ont perdu le contrôle de l'expression de certaines de leurs fonctions spécialisées, tendant à une simplification physiologique.

Rejoignant la théorie de WARBURG, GREENSTEIN (23) met en évidence une uniformisation des activités enzymatiques parmi les cellules néoplasiques : le tableau II montre le sens des variations enzymatiques et suggère l'existence d'un modèle ordonné et spécifique de l'expression génétique dans le spectre des néoplasmes.

Enfin, au cours de la transformation néoplasique d'un tissu adulte apparaissent des protéines de type foetal ; les exemples suivants, soulignent l'analogie d'expression entre une cellule cancéreuse et une cellule embryonnaire (25):

1. L'apparition de l'  $\alpha$ -foetoprotéine, l' $\alpha_2$ -H-globuline, la ferroprotéine, l' $\alpha$ -glycoprotéine foetale dans le sérum des animaux porteurs d'une tumeur ;

2. Les caractéristiques foetales de l'hémoglobuline dans la leucémie ;

3. L'identité des antigènes placentaires chez la femme gestante et les sujets cancéreux ;

4. La déviation isozymique de type foetale, pour certains enzymes tels que la phosphatase alcaline (26), l'hexokinase, la pyruvate-kinase, l'aldolase (27), les transaminases des acides aminés à chaîne branchée (28).

Tableau II : Les discriminants biochimiques en relation avec le taux de croissance des hépatomes ( \* )

---

METABOLISME DES GLUCIDES :	Stimulation de la glycolyse et de la production d'ATP; diminution de la néoglucogénèse; diminution de la sensibilité des enzymes de la néoglucogénèse et de la glycogénogénèse à la stimulation par les hormones.
METABOLISME DES AC. NUCLEIQUES :	Augmentation de la synthèse de l'ADN et des ARN; diminution de leur catabolisme.
METABOLISME DES PROTEINES :	Augmentation de la synthèse de protéines totales; diminution de l'activité des enzymes cataboliques des acides aminés.
AUTRES VOIES METABOLIQUES :	Stimulation de la synthèse des polyamines; diminution de l'activité des enzymes du cycle de l'urée; diminution du métabolisme lipidique.

---

( \* ) d'après BUSCH (24)

L'ensemble de ces caractères physiologiques des cellules tumorales, décrits à la suite d'études "in vivo" et "in vitro", et analogues sur de nombreux aspects à ceux d'un tissu embryonnaire (duquel elles diffèrent par leur caractère supposé irréversible), ont conduit aux théories suivantes, qui expriment toutes un concept commun:

- a) celle de PIERCE (29) , qui considère le cancer du point de vue d'une différenciation post-embryonnaire : tous les caractères malins ont déjà été exprimés au cours du développement, suggérant que le génome normal contient l'information pour l'expression maligne et que le métabolisme des cellules néoplasiques serait une altération du contrôle de l'expression génétique.
- b) celle de POTTER (30), qui définit sur les tératocarcinomes le concept de "Oncogeny as blocked ontogeny".
- c) la théorie de la Rétro-différenciation de COGGIN (31), selon laquelle certains gènes de l'embryogénèse précoce sont réexprimés dans le cancer.

Désormais, le problème du cancer n'apparaît plus seulement comme l'expression d'une mutation, d'une délétion génétique définitive, comme le suggèrent les variations caryotypiques, le caractère irréversible et héréditaire de la transformation cancéreuse, mais encore il peut être considéré comme une modification épigénétique dans une cellule possédant une information génétique complète.

L'utilisation de cellules tumorales "in vitro", faciles à propager, clonables et capables de conserver une fonction spécialisée mais exprimée souvent sous forme simplifiée, est à l'origine de nombreux travaux approfondissant les processus de différenciation cellulaire et moléculaire, et les mécanismes régulateurs responsables de l'activation et de la modulation sélective de certains gènes, telles qu'elles se produisent dans le tissu sain d'origine. Le tableau III présente quelques exemples positifs et fructueux de telles investigations.

Tableau III : Expression de fonctions différenciées, caractéristiques du tissu sain d'origine, dans des cellules tumorales en culture. ( \* )

TYPE CELLULAIRE	PRODUIT DE DIFFERENCIATION	REFERENCES
Hépatome	Induction de la TAT par les stéroïdes	TOMKINS, 1969
Tératocarcinome	Différenciation multipotentielle Antigènes du locus T	FINCH et EPHRUSI, 1967 ARTZT, 1974
Choriocarcinome	Gonadotropine chorionique humaine, différenciation multipotentielle	PATILLO, 1968
Neuroblastome	Protéine S-100, formation d'axones, neurotransmetteurs	SEEDS, 1970
Tumeur des cellules de Leydig	Synthèse de stéroïdes	YASUMURA, 1966
Tumeur pituitaire	ACTH, Prolactine, STH	YASUMURA, 1966
Tumeur du cortex surrénalien	Synthèse de stéroïdes en réponse à l'ACTH	YASUMURA, 1966
Tumeur parathyroïdienne	Hormone parathyroïdienne	DEFTOS, 1968

( \* ) d'après COX (20)

## SYNTHESE DE GLYCOGENE DANS LES CELLULES ZHC EN CULTURE

Ainsi, c'est pour aborder un problème de régulation d'une fonction différenciée à l'aide d'un matériel biologique commode, qu'a débuté ce travail de recherche dans notre laboratoire, avec l'étude du processus de contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel induit par les hormones glucocorticoïdes. Nous disposions pour cela de deux lignées établies de cellules d'hépatome de rat :

- d'une part, les cellules HTC, qui répondent à la présence de corticoïdes dans le milieu de culture par une néosynthèse de la tyrosine-aminotransférase (32) ;
- d'autre part, les cellules de l'hépatome de ZAJDELA (ZHC) dans lesquelles les stéroïdes n'induisent pas la synthèse de l'enzyme. Ce projet d'étude a été réorienté vers une autre voie à la suite d'une observation tout à fait fortuite à propos des cellules de ZAJDELA. Lors de la préparation d'un extrait cellulaire de chacune de ces deux souches, nous avons observé après sonication la persistance d'une opalescence très nette dans les cellules ZHC adaptées depuis quelques mois à la culture "in vitro", alors que le sonicat des cellules HTC, à la même concentration cellulaire, devenait parfaitement limpide. Cette observation nous a suggéré la présence de glycogène dans les cellules, et l'obtention d'une coloration acajou du sonicat avec le test qualitatif à l'iode confirma notre supposition.

Cette observation était singulière sur plus d'un point. En effet, lors de l'établissement de la tumeur ascitique chez le rat, la capacité de stocker le glycogène avait disparu progressivement, et F. ZAJDELA, décrit alors les observations suivantes (33,34) : "A l'examen d'un frottis d'ascite du 32ème passage, il se révéla que lorsque la réaction PAS était positive, elle l'était toujours sur la totalité d'un îlot ascitique. L'évolution de la population PAS+ a été suivie au fur et à mesure des repiquages dans l'animal ; son comportement était celui d'une souche minoritaire et défavorisée par rapport au reste des cellules, car ses derniers représentants ont disparu à partir du 74ème passage pour ne plus reparaitre depuis". Par

ailleurs nous nous sommes aperçus que la capacité de stockage de glycogène dans les cellules ZHC semblait liée à l'environnement et aux conditions de nutrition et de croissance des cellules. Enfin, la bibliographie ne signale aucun phénomène analogue de réapparition de fonction spécialisée dans les cellules d'hépatome "in vivo" et "in vitro", pour lesquelles la capacité de stocker le glycogène est même l'une des premières fonctions à disparaître lors de la transformation néoplasique.

Nous étions donc en présence d'un matériel biologique peu commun, dont les propriétés avaient tout pour aiguïser la curiosité d'une équipe de recherche sur les mécanismes de régulation de l'expression d'une fonction cellulaire.

#### ANALYSE DE CE PHENOMENE DE RESURGENCE D'UNE FONCTION SPECIALISEE

Le problème que posent les cellules de Zajdela et qui est schématisé en figure 2, est celui de comprendre les mécanismes impliqués dans l'expression de la fonction glycogénogénique dans diverses conditions expérimentales. Notre exposé aujourd'hui à l'occasion de cette 3<sup>e</sup> Ecole Franco-Africaine de Biologie Moléculaire se limitera donc :

a. dans une première partie de décrire au moyen de la microscopie optique et électronique ce phénomène de réversibilité dans des cellules tumorales adaptées aux conditions de culture "in vitro", d'une fonction spécialisée caractéristique du tissu sain dont elles dérivent;

b. dans une seconde partie, de l'analyser par des techniques biochimiques, nécessaires pour traduire les variations quantitatives des métabolites intracellulaires et des activités enzymatiques en cause. Au cours de ces déterminations quantitatives, nous nous sommes référés à des tissus témoins :

- Le foie de rat adulte et normal, qui constitue un témoin positif pour le glycogène;
- Un autre hépatome, les cellules HTC, choisi comme témoin négatif, car il est incapable de stocker du glycogène.

Sans mentionner les détails qui seront évoqués au cours de l'exposé, nous décrirons ici seulement les principaux résultats obtenus jusqu'à présent avec ce système. Bien entendu, il reste